

**Produktionsverfahren für Di-*myo*-Inositol-1-1'-phosphat:  
Isolierung im Technikumsmaßstab und Versuche  
zur Etablierung eines  
rekombinanten Synthesystems in *E. coli***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs  
Biologie und Geografie

an der Universität Duisburg-Essen  
Campus Essen

vorgelegt von

Bianca Reichstein

aus Gifhorn

Juli 2005

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Biologie in der Abteilung Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Hensel

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2005

## Schein und Sein

Beschränkt:

*Halt dein Rößlein nur im Zügel,  
Kommst ja doch nicht allzuweit.  
Hinter jedem neuen Hügel  
Dehnt sich die Unendlichkeit.  
Nenne niemand dumm und säumig,  
Der das Nächste recht bedenkt.  
Ach, die Welt ist so geräumig,  
Und der Kopf ist so beschränkt.*

Wilhelm Busch (1832-1908)

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die Domäne der Archaea .....	1
1.2	Enzyme thermophiler Organismen und ihre technische Anpassung.....	4
1.3	Kompatible Solute.....	4
1.4	Produktion von DIP.....	8
1.5	Aufgabenstellung .....	9
2	MATERIAL UND METHODEN .....	10
2.1	Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	10
2.2	Geräte .....	12
2.3	Organismen .....	13
2.4	Anzucht der Organismen .....	14
2.4.1	Batch-Fermentation von <i>P. woesei</i> und <i>P. furiosus</i> .....	14
2.4.2	Kontinuierliche Fermentation von <i>P. furiosus</i> zur Produktion von Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat (DIP).....	15
2.4.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.5	Molekularbiologische Arbeiten mit DNA .....	16
2.5.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. woesei</i> und <i>P. furiosus</i> .....	16
2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	16
2.5.3	DNA-Konzentrierung.....	17
2.5.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	17
2.5.5	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA.....	17
2.5.6	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	17
2.5.7	Polymerase-Kettenreaktion .....	18
2.5.8	Enzymatische Modifikationen von DNA .....	19
2.5.9	Transformation .....	20
2.5.10	DNA-Sequenzierung .....	20
2.5.11	Computergestützte Auswertung von Nucleotidsequenzen .....	21
2.6	Analytik und Präparation niedermolekularer Komponenten.....	21
2.6.1	Ionenchromatographie .....	21
2.6.2	Herstellung der Eluenten .....	21
2.6.3	Probenvorbereitung.....	22
2.6.4	Gerätekonfiguration und Elutionsbedingungen .....	22
2.6.5	Kernresonanzspektroskopie .....	22
2.6.6	Herstellung von <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat .....	22
2.6.7	Herstellung von Cytidin-5'-diphosphat- <i>myo</i> -Inositol .....	23
2.6.8	Extraktion und Reinigung von Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat (DIP) im Technikumsmaßstab .....	24

2.6.9	Colorimetrische Bestimmung von Phosphat.....	24
2.7	Proteinanalytische Methoden .....	25
2.7.1	Ultrafiltration.....	25
2.7.2	Proteinbestimmung [modifiziert nach BRADFORD, 1976] .....	25
2.7.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.7.4	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen .....	27
2.7.5	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter nativen Bedingungen.....	27
2.7.6	Elektro-Proteintransfer „Western-Blot“ .....	27
2.7.7	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz .....	28
2.7.8	Kristallisation .....	28
2.7.9	Heterologe Expression der <i>P. woesei</i> <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat Phosphatase (IMP), <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat Synthase (IPS) und der CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyltransferase (CICT) .....	29
2.7.10	Enzymtest der rekombinanten <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat Synthase (IPS) .....	29
2.7.11	Enzymtest der rekombinanten <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat Phosphatase (IMP) ...	30
2.7.12	Enzymtest für die putativen CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyltransferasen (CICT's) .....	30
2.7.13	Enzymtest für die putativen CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyltransferasen über Dünnschichtchromatographie (TLC).....	30
2.7.14	Reinigung und Solubilisierung von „inclusion bodies“ .....	31
2.7.15	Renaturierung des Proteins aus <i>inclusion bodies</i> über Ni-NTA .....	32
2.7.16	Enzymtest für die Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat Synthase aus <i>P. woesei</i> .....	32
2.7.17	Anreicherung der DIPS aus <i>P. woesei</i> .....	32
2.7.18	Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose .....	34
2.7.19	Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	34
2.7.20	Präparative Gelfiltration HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrad.....	34
2.7.21	Bromcyanspaltung .....	34
3	ERGEBNISSE .....	35
3.1	Kontinuierliche Fermentation von <i>P. furiosus</i> zur Produktion von Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat .....	35
3.2	Aufreinigung von Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat aus <i>P. furiosus</i> .....	39
3.3	Herstellung der DIP-Synthese-Intermediate .....	40
3.3.1	Synthese von <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat .....	40
3.3.2	Synthese von Cytidin-5'-diphosphat- <i>myo</i> -Inositol.....	42
3.4	Anreicherung und Identifizierung der Di- <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat Synthase (DIPS) aus <i>P. woesei</i> .....	43
3.4.1	Anreicherung der DIPS aus <i>P. woesei</i> Rohextrakt .....	43
3.4.2	Bestimmung der molekularen Masse der angereicherten DIPS.....	47
3.4.3	Bromcyanspaltung und Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Fragmente .....	48

3.4.4	Identifizierung eines Gens von <i>P. furiosus</i> , das für ein homologes Protein der vermuteten DIPS von <i>P. woesei</i> kodiert .....	49
3.4.5	Klonierung des homologen Gens PF1399 aus <i>P. woesei</i> in den Expressionsvektor pET24a.....	50
3.4.6	Expression des rekombinanten Proteins von <i>P. woesei</i> in <i>E. coli</i> .....	51
3.5	Klonierung und Expression der putativen Nucleosidtriphosphat-Hexosephosphat-Nucleotidyltransferasen von <i>P. woesei</i> zur Synthese von CDP-Inositol.....	52
3.5.1	Klonierung der putativen Nucleosidtriphosphat-Hexosephosphat-Nucleotidyltransferasen .....	52
3.5.2	Charakterisierung der putativen Nucleosidtriphosphat-Hexosephosphat-Nucleotidyltransferasen Trans7 und Trans1 .....	56
3.6	Weiterführende Untersuchungen an der rekombinanten <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat Synthase und der Inositol-Monophosphatase von <i>P. woesei</i> .....	65
3.6.1	Reinigung der rekombinanten Proteine.....	65
3.6.2	Kristallisation von IPS und IMP .....	66
3.6.3	Untersuchungen zur Molekülmasse und Enzymatik der IMP .....	68
4	DISKUSSION .....	70
4.1	Produktion von Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat im Technikumsmaßstab .....	70
4.1.1	Kontinuierliche Fermentation von <i>P. furiosus</i> .....	70
4.1.2	Extraktion von Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat.....	72
4.2	Enzymatik des Biosynthesewegs von Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat .....	73
4.2.1	Anreicherung der Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-phosphat Synthase .....	74
4.2.2	Molekulare Eigenschaften der IMP .....	74
4.3	Identifizierung von Nucleosiddiphosphat-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferasen.....	76
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	78
6	LITERATUR .....	79
7	ANHANG.....	88

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest	<i>aqua bidestillata</i> = zweifach destilliertes Wasser
abs.	absolut
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam <sup>r</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
CAPS	3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonsäure
CIP	calf intestinal phosphatase = Alkalische Phosphatase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DEAE	Diethylaminethylether
d.h.	dass heißt
DIP	Di- <i>myo</i> -inositol-1,1'-phosphat
DIPS	Di- <i>myo</i> -inositol-1,1'-phosphat Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
et al.	et alii = und andere
etc.	et cetera = und des Weiteren
Fe <sup>3+</sup>	Eisen(III)
F1,6P	Fruktose-1,6-bisphosphat
F6P	Fruktose-6-phosphat
g	Gramm
x g	Fallbeschleunigung
Glk	Glukose
G6P	Glukose-6-phosphat
h	hour = Stunde
H <sub>2</sub>	Wasserstoff

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Hz	Hertz
I1P	Inositol-1-phosphat
IMP	Inositol Monophosphatase
Ins	Inositol
IPS	Inositol-1-phosphat Synthase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
J	Kopplungskonstante
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactat Dehydrogenase
M	molar (mol/l)
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
mA	Milliampere
ME	Mercaptoethanol
MHz	Megahertz
$\mu$	mikro (10 <sup>-6</sup> )
MCS	multiple cloning site = Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MW	Molekulargewicht
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NaOAc	Natriumacetat
nC	Nanocoulomb
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	nuclear magnetic resonance = kernmagnetische Resonanz
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NTP	Nuklosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p. a.	<i>pro analysis</i> = für die Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
<i>Pwo</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>P. woesei</i>
ppm	parts per million
psi	pounds per square inch



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RE	Rohextrakt
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
S <sup>0</sup>	elementarer Schwefel
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> = Natriumdodecylsulfat
sec	Sesunde
s./s.o./s.u.	siehe/siehe oben/siehe unten
spez.	spezifische
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit = Enzymaktivität
u. a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
V <sub>max</sub>	maximale Geschwindigkeit
verd.	verdünnt
W	Watt
www	<i>world wide web</i>
z.B.	zum Beispiel

## UIPAC-Code

### Nukleinsäuren

B: G/T/C	D: G/A/T	K: G/T	M: A/C	N: A/C/T/G
S: G/C	V: G/A/C	Y: T/C	H: A/T/C	R: A/G
W: A/T				

### Aminosäuren

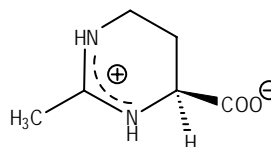
A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	T	Threonin
E	Glutaminsäure	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	X	unspezifisch
H	Histidin	Q	Glutamin	Y	Tyrosin

# STRUKTURFORMELVERZEICHNIS

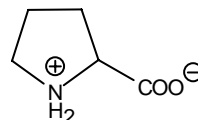
Nr. Nomenklatur

Strukturformel

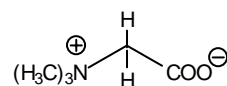
1 Ectoin



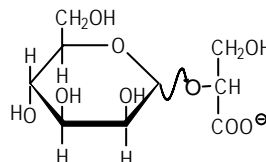
2 Prolin



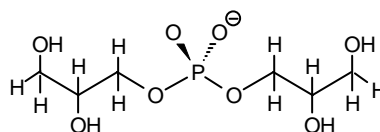
3 Betain



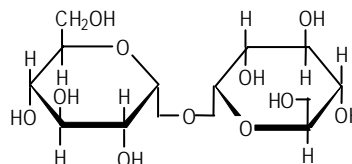
4  $\alpha,\beta$ -Mannosylglycerat



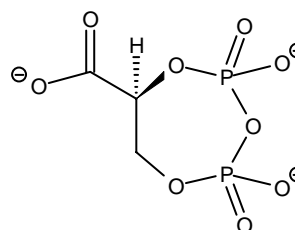
5 Di-glycerol-phosphat



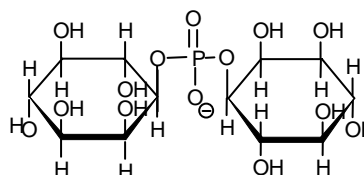
6 Trehalose



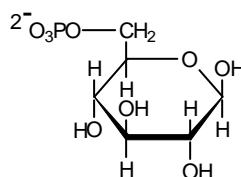
7 cyclisches 2,3-Diphosphoglycerat



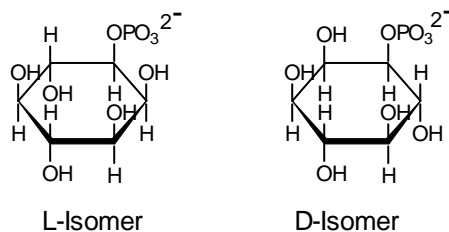
8 Di-*myo*-inositol-1,1'-phosphat



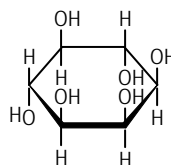
- 9 Glukose-6-phosphat



- 10 *myo*-Inositol-1-phosphat

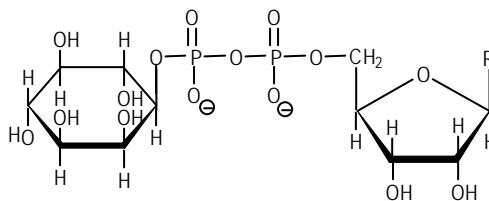


- 11 *myo*-Inositol



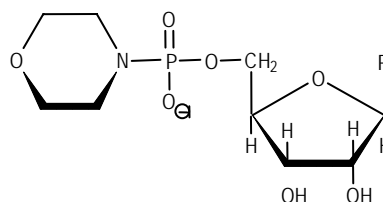
R = Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin

- 12 Nukleosid-5'-diphosphat-*myo*-inositol

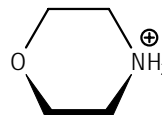


R = Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin

- 13 Cytidin-5'-phosphoromorpholidat

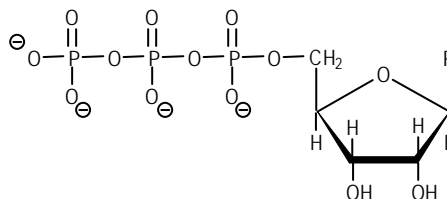


- 14 Morpholidat

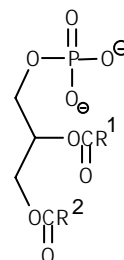


R = Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin

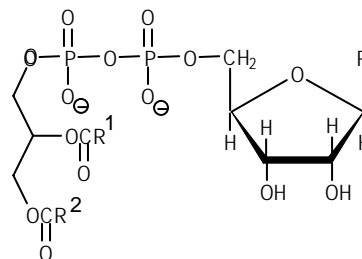
- 15 Nukleosid-5'-triphosphat



- 16 Diacylglycerol-monophosphat

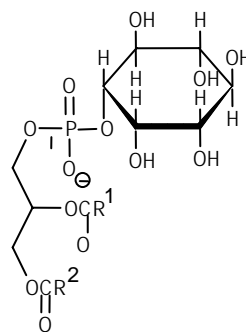


- 17 Cytidin-5'-diphosphat-diacylglycerol



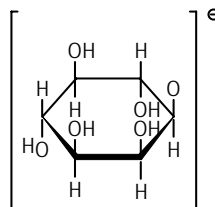
R = Cytosin; R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>= Fettsäuren

- 18 Phosphatidylinositol

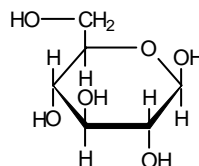


R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>= Fettsäuren

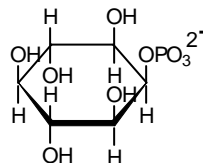
- 19 Oxyanion des *myo*-Inositols



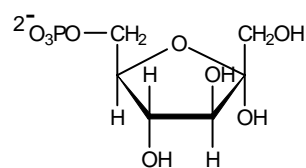
- 20 β-D-Glukose



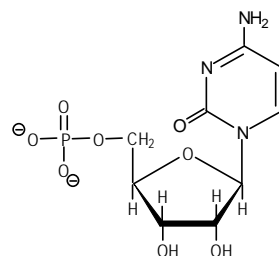
- 21 *myo*-Inositol-2-phosphat



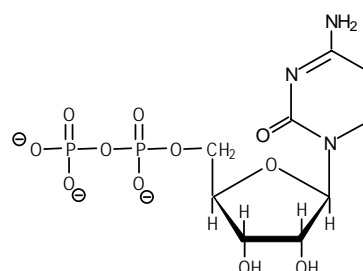
- 23 Fruktose-6-phosphat



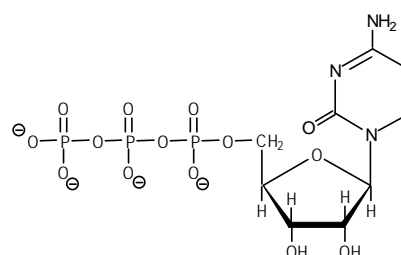
- 24 Cytidin-5'-monophosphat



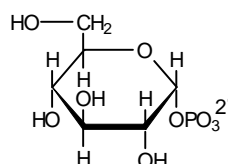
- 25 Cytidin-5'-diphosphat



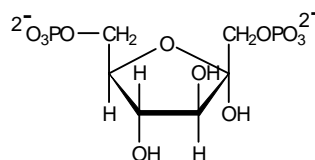
- 26 Cytidin-5'-triphosphat



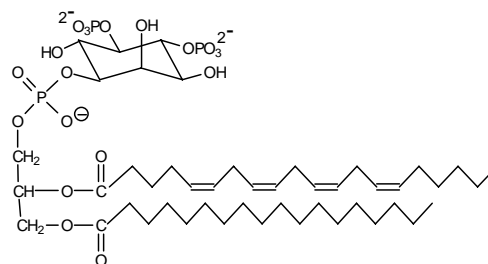
- 27 Glukose-1-phosphat



- 28 Fruktose-1,6-diphosphat



- 29 Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Domäne der Archaea

Die Entstehung der Erde wird auf etwa 4,6 Milliarden Jahre [ENGEL, 1969] zurückdatiert. Vermutlich war im Anfangsstadium die Erdoberfläche enorm heiß; es wird vermutet, dass die bodennahe Temperatur kurz nach der Entstehung etwa 180°C betrug. Die Abkühlung vollzog sich sehr langsam. Vor 4 Milliarden Jahren unterschritt die Temperatur womöglich das erste Mal die 100°C-Grenze. Bei der weiteren Abkühlung des Magmas entstand über weite Bereiche der Oberfläche eine brüchige Kruste, die an vielen Stellen von Meteoriten durchschlagen wurde. Man nimmt daher an, dass durch dieses Bombardement die Urmeere durch das aufsteigende Magma auf Temperaturen über 110°C [NISBET & SLEEP, 2001] erhitzt wurden. Die Zusammensetzung der Uratmosphäre unterschied sich wohl stark von der heutigen Erdatmosphäre. Vermutlich enthielt sie viel Kohlendioxid, Wasserstoff, Methan und Ammoniak, jedoch wenig freien Sauerstoff [KASTING, 1993]. Nach bisherigen Erkenntnissen muss man wohl davon ausgehen, dass schon sehr früh Leben auf unserem Planeten existierte. So weisen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von über 15‰ in den Isua Metasedimenten auf Grönland darauf hin, dass organische C-Fixierung bereits vor 3,8 Mrd. Jahren stattfand [SCHIDLowski, 1995]. Zum Ablauf der präbiotischen und frühbiotischen Evolution existieren verschiedene Hypothesen. Bis heute gibt es keine zusammenhängende Theorie, die erklären kann, wie das Leben entstand.

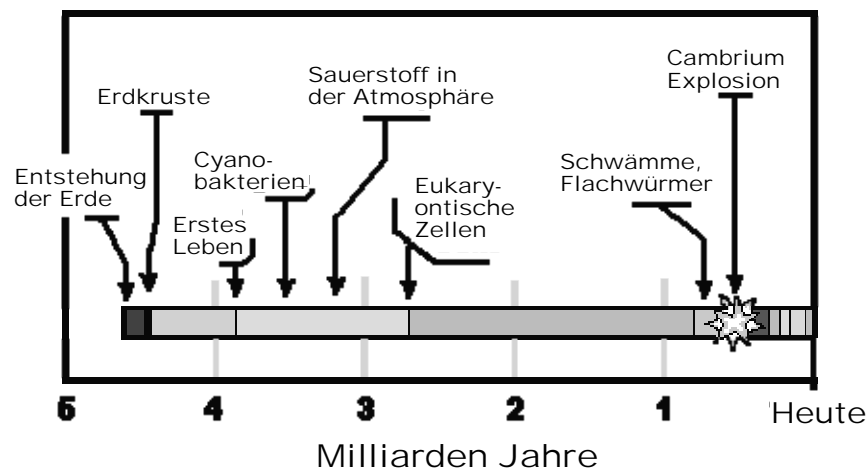


Abb. 1.1.: Zeitskala der Evolution: Von der Entstehung der Erde bis heute. Modifiziert nach [ASMOV, 1991] Die Entstehung des Lebens wird auf ca. 3,8 Mrd. Jahre zurückdatiert.

Hypothesen zur präbiotischen Evolution müssen verschiedene Aspekte erklären: Die abiogene Entstehung der Biomoleküle, d.h. ihre Entwicklung aus nicht lebenden bzw. nichtorganischen Vorläufern [MILLER & UREY, 1959], die Entstehung sich selbst replizierender chemischer Informations-Systeme [OHNO, 1987], die Entstehung der

gegenseitigen Abhängigkeit von Funktion (Enzyme) und Information (RNA, DNA) [PICCIRILLI et al., 1987] unter den Umweltbedingungen der Erde vor 4,5 bis 3,5 Milliarden Jahren [SUESS, 1975] (Abb. 1.1).

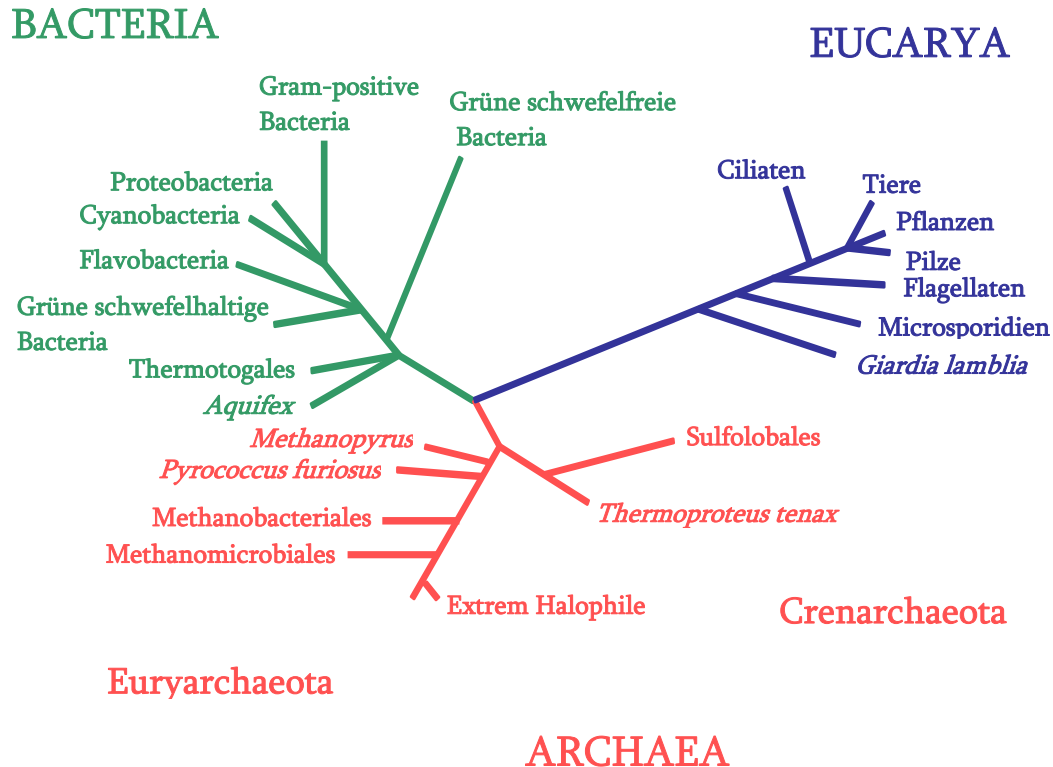


Abb. 1.2.: Phylogenetischer Stammbaum des Lebens [verändert nach PACE, 1997]. Verzweigungsmuster und Verzweigungslängen basieren auf 16S und 18S rRNA-Sequenzvergleichen [WOESE et al., 1990].

So ist zu vermuten, dass sich die erste mikrobielle Lebensgemeinschaft aufgrund der vorherrschenden Bedingungen aus thermophilen chemotrophen Organismen zusammensetzte [FORTERRE, 1996; NISBET & FOWLER, 1996]. Nur hyperthermophile Organismen, mit Wachstumsoptima über 80°C, konnten sich vermutlich unter solchen Bedingungen entwickeln [BLÖCHL et al., 1992; PACE, 1991; WÄCHTERHÄUSER, 1988]. Es wird angenommen, dass hyperthermophile Prokaryonten den phylogenetisch ältesten Organismen angehören und dem postulierten Progenoten (dem Uroorganismus) am nächsten stehen [KANDLER, 1992; WÄCHTERHÄUSER 1988]. Dies zeigen auch die auffallend kurzen phylogenetischen Astlängen des über 16 S rRNA-Analysen entwickelten Stammbaums des Lebens [WOESE & FOX, 1977; WOESE et al., 1990] (Abb.1.2.). Gleichwohl muss hier darauf hingewiesen werden, dass die langsam evolvierten Hyperthermophilen keinesfalls als „primitiv“ zu bezeichnen sind. Einige Organismen mögen phenotypisch primitiven Lebensformen entsprechen, doch stellen alle heute lebenden Organismen an ihre „ökologische Nische“ erfolg-



reich angepasste Lebewesen dar. Anfang der 70er Jahre führte die Entwicklung molekularbiologischer Arbeitstechniken zu neuen Vorstellungen über die Diversifikation des Lebens und zur Erstellung eines universellen Stammbaumes (siehe Abb. 1.2). Insbesondere die Sequenzvergleiche von 16 S und 18 S rRNA ließen eine sehr frühe Aufspaltung nicht wie früher angenommen in zwei, sondern in drei Entwicklungslinien erkennen, deren Deszendenten die Domänen der Eucarya, Bacteria und Archaea (gr. *archaios*, ursprünglich) bilden [WOESE & FOX, 1977; WOESE & OLSEN, 1986]. Somit stehen die Archaea als eine zweite prokaryontische Entwicklungslinie den Eucarya gegenüber [WINKER & WOESE 1991; WOESE & FOX, 1977; WOESE et al., 1990].

Archaea unterscheiden sich deutlich von Bacteria und Eucarya im Aufbau der Zellwand und der Cytoplasmamembran. So bestehen die Zellwände der Archaea entweder aus Protein, Pseudomurein, Polysaccharid oder aus Chondroitin. Bislang ist in keinem archaealen Vertreter Murein, der bakteriellen Zellwand, gefunden worden. Auffallenderweise besitzen Archaea einen zu Bacteria und Eucarya deutlich unterschiedlichen Typ von polaren Lipiden. So finden wir hier Anstelle von 1,2-Diacyl-glyceriden 2,3-Diisoprenoidether [DE ROSA & GAMBACOTA, 1988; DE ROSA et al., 1993; LANGWORTHY & POND, 1998]. Das Transkriptionssystem, insbesondere die Struktur der RNA-Polymerase, des Promotors und der basalen Transkriptionsfaktoren [THOMM, 1996] sowie das Vorhandensein von Histonen zumindest bei einem Teil der Archaea, weist auf eine Verwandtschaft zu den Eucarya hin. Eine bevorzugte Ähnlichkeit zu den Bacteria zeigt sich dagegen in der Morphologie, dem Fehlen eines Nucleus, dem polycistronischen Aufbau von Operons [ACHENBACH-RICHTER & WOESE, 1988] und in einzelnen Aspekten des Stoffwechsels [DE VOS et al., 1998]. Die Domäne der Archaea spaltet sich in die drei Hauptäste Crenarchaeota, Euryarchaeota und die nicht kultivierbaren Korarchaeota auf. Neuerdings wird die Bildung einer vierten Gruppe vorgeschlagen: die der Nanoarchaeota mit dem bislang einzigen bekannten Vertreter *Nanoarchaeum equitans*. [HUBER et al., 2002]. Die bis jetzt kultivierten Crenarchaeota sind meist hyperthermophile chemolithoautotrophe Archaea. Die Euryarchaeota sind hingegen eine physiologisch äußerst diverse Gruppe mit vielen extremophilen Organismen. Es kommen methanogene, extrem halophile und hyperthermophile Vertreter vor. Methanogene Euryarchaeota sind strikt anaerob, wogegen beispielsweise die meisten extrem halophilen Archaea sowohl aeroben als auch fakultativ anaeroben Stoffwechsel betreiben können. Des Weiteren können sie über Bacteriorhodopsin Lichtenergie zur ATP-Synthese nutzen. Als Energiequelle spielen die in Vulkangasen enthaltenen Schwefelverbindungen und Wasserstoff eine zentrale Rolle, als Kohlenstoffquelle CO<sub>2</sub>. Der chemolithotrophe Stoffwechsel kann anaerob oder aerob erfolgen [SCHÖNHEIT & SCHÄFER, 1995; DE ROSA et al., 1984].

## 1.2 Enzyme thermophiler Organismen und ihre technische Anpassung

Anpassung eines Organismus an extreme Bedingungen bedeutet, dass alle Zellkomponenten unter diesen Bedingungen ausreichend stabil und physiologisch aktiv sind [BROCK, 1967]. Für die Biotechnologie sind insbesondere Enzyme interessant, die an hohe Temperaturen angepasst sind, da bei zahlreichen industriellen Applikationen Biokatalysatoren benötigt werden, die sich durch hohe Stabilität auszeichnen [BERTOLDO & ANTRANIKIAN, 2002; BERTOLDO et al., 2001; COWAN, 1992]. So besitzen die Proteine dieser Organismen Eigenschaften, die sie gegen Denaturierung schützen. Zu diesen Determinanten, die für erhöhte Thermostabilität verantwortlich gemacht werden, zählen ein höherer Anteil an hydrophoben Aminosäuren, Ionenpaarbindungen, Oligomerisierung [WALDEN et al., 2004; WALDEN et al., 2001] und Vermeidung von deamidierbaren Aminosäurenresten wie Asparagin und Glutamin.

Für die Anwendung extremophiler Mikroorganismen in der Biotechnologie kommen entweder die Organismen selbst oder die von ihnen produzierten Enzyme und Zellkomponenten zum Einsatz [GOVARDHAN & MARGOLIN, 1995]. Die Applikation von Enzymen aus extremophilen Mikroorganismen kann die verschiedensten industriellen Bereiche, wie z.B. die Waschmittel-, die Lebensmittel-, die Textil-, die Papier- und die pharmazeutische Industrie umfassen [ANTRANIKIAN & GROTE, 1997]. Hierbei haben biotechnologische Verfahren gegenüber traditionellen Methoden den Vorteil, dass sie in der Regel weniger Prozessschritte benötigen und umweltverträglicher sind, indem sie beispielsweise die Salzfracht (im Falle der Aminosäureproduktion) oder den Einsatz aggressiver Substanzen (Chlor in der Papierbleiche) zu reduzieren helfen [NEMATI et al., 2000; KADAR et al., 2004]. Ein weiterer Vorteil, der für den Einsatz von Enzymen spricht, ist deren hohe Stereospezifität im Vergleich zu chemischen Umsetzungen, bei denen häufig eine aufwendige und kostenintensive Racemattrennung erfolgen muss [DANIEL et al., 1996]. Die Enzyme extremophiler Mikroorganismen zeichnen sich darüber hinaus durch eine hohe Stabilität gegenüber Chelatbildnern, Detergenzien und denaturierenden Reagenzien aus, die in einer Vielzahl von industriellen Verfahren und Produkten zum Einsatz kommen [LIAO, 1993].

## 1.3 Kompatible Solute

Neben den zuvor genannten intrinsischen Faktoren tragen auch Umgebungsbedingungen, d.h. extrinsische Faktoren zur Aufrechterhaltung der physiologisch aktiven Struktur von Makromolekülen bei. Häufig sind hier niedermolekulare, lösliche vorwiegend geladene Substanzen (sog. kompatible Solute) beteiligt, die zu hohen Konzentrationen in der Zelle akkumuliert werden können, ohne Einfluss auf den Metabolismus der Zelle zu nehmen.

Nach Timasheff beruht die stabilisierende Wirkung der kompatiblen Solute auf einem Ausschluss des jeweiligen Sutes aus der das Makromolekül unmittelbar umschließenden Lösungsmittelhülle. Unter thermodynamischen Gesichtspunkten stellt diese „*preferential exclusion*“ eine ungünstige Situation dar, da hier eine Ungleichverteilung des kompatiblen Sutes vorliegt. Als Folge nimmt das Makromolekül eine möglichst kompakte Struktur an, die die geringste Oberfläche und damit das kleinste mögliche Solut-freie Volumen bedingt [ARAKAWA & TIMASHEFF, 1985].

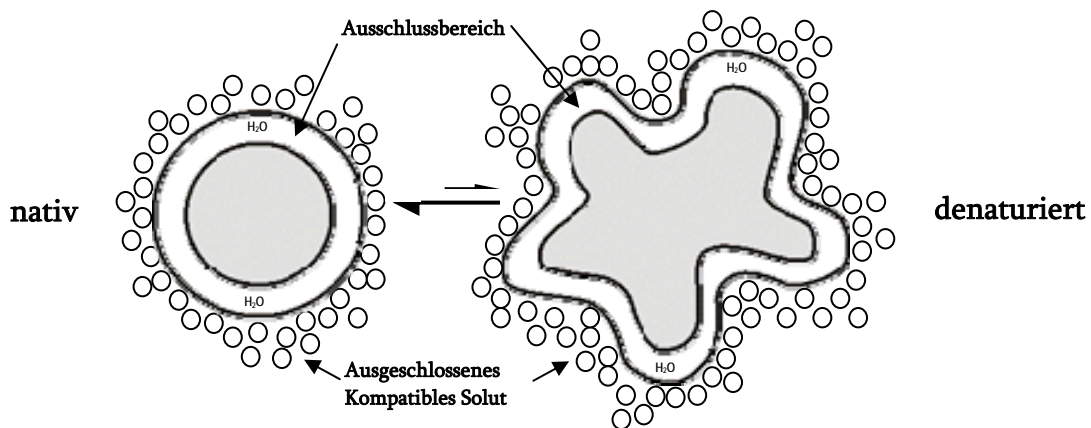


Abb. 1.3.: Denaturierung eines Proteins in einer Lösung, die kompatible Solute enthält [nach TIMASHEFF, 1998] *Preferential exclusion* von kompatiblen Soluten. Der Mechanismus des Ausschlusses von der Proteinoberfläche hängt vom Protein selbst ab.

Kompatible Solute wurden erstmals in Zusammenhang mit der Osmostressantwort verschiedener Organismen identifiziert und seitdem auch als Osmoprotektiva bezeichnet [FARIA et al., 2004; LANDFALD & STRØM, 1986; WOOD, 1988]. Sie gehören verschiedenen Stoffklassen an, welche charakteristisch für die unterschiedliche Salztoleranz der jeweiligen Organismen sind: Zucker (Trehalose [6] und Saccharose) und Schwefelverbindungen (z.B. Dimethylsulfonopropionat) sind typisch für nicht halophile und halotolerante Mikroorganismen [COSQUER et al., 1999]. Solute dieser Gruppe werden in cytoplasmatischen Konzentrationen bis zu etwa 500 mM synthetisiert. Insbesondere Trehalose wird als allgemeiner Stressmetabolit angesehen und wird auch von *E. coli* akkumuliert [WELSH & HERBERT, 1999]. Polyole (Glycerol, Arabitol, Inositol [11]) treten bei halophilen Pilzen sowie bei salztoleranten Pflanzen auf [PETROVIC et al., 2002]. Aminosäuren und Aminosäurederivate sind für Organismen mit erhöhter Salztoleranz charakteristisch und können in Konzentrationen über 500 mM akkumuliert werden. Dazu gehören Prolin [2], die Tetrahydropyrimidinderivate Ectoin [1] und Hydroxyectoin, Glycinbetain, acetylierte Diaminosäuren und Glutaminderivate. Die Akkumulation erfolgt durch *de novo*-Synthese und durch Aufnahme aus dem Medium. Die Aufnahme der Solute wird, wenn beide

Möglichkeiten offen stehen, bevorzugt, da sie energetisch günstiger ist [CANOVAS et al. 1996]. Mikroorganismen, die an salinen Standorten leben, sind einer hohen Ionenstärke und Wassermangel ausgesetzt. Die hohe Ionenkonzentration ist gleichbedeutend mit einer verringerten Wasseraktivität, so dass saline Biotope als (physiologisch) trockene Standorte zu betrachten sind. Da Wasser über die Zellmembran frei permeabel ist, verliert ein nicht halophiler Organismus aufgrund der unterschiedlichen Wasseraktivität sein freies Zellwasser in das saline Außenmedium. Halophile Mikroorganismen verhindern die Dehydratisierung, indem sie die Wasseraktivität ihres Cytoplasmas auf das Niveau des Außenmediums erniedrigen. Hierzu werden entweder selektiv  $K^+$  Ionen aufgenommen (extrem halophile Archaea) oder kompatible Solute akkumuliert (phototrophe/aerobe chemoorganotrophe Bacteria).

In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass kompatiblen Soluten auch bei der Anpassung an andere widrige Bedingungen wie Kälte, Hitze und Trockenheit eine bedeutende Rolle zukommt und, dass sie daher eher als generelle Stressprotektiva zu sehen sind [DA COSTA et al, 1998; SANTOS UND DA COSTA, 2001]. Die schützende Wirkung von Trehalose [6] gegen viele dieser Stressfaktoren konnte mehrfach demonstriert werden [SINGER & LINDQUIST, 1998; SIMOLA et al, 2000], und der Akkumulation von Glycerol, dem vorherrschenden Osmolyt in Hefen, konnte eine Thermotoleranz zugewiesen werden [SIDERIUS et al., 2000]. Thermophile und Hyperthermophile akkumulieren hingegen Kompatible Solute wie Mannosylglycerat [BORGES et al., 2002] [4], zyklisches 1,2-Diphosphoglycerat [7] und Di-*myo*-Inositol-1,1-phosphat (DIP) [8], die bis jetzt nicht oder in sehr niedrigen Konzentrationen in mesophilen Organismen gefunden werden konnten. Dies scheint eine Anpassung an das Leben bei hohen Temperaturen zu sein. Diese Solute sind wie bei allen Archaea im Gegensatz zu den neutralen und zwitterionischen Soluten der Bacteria generell negativ geladen. Ausnahmen jedoch stellen z.B. das thermophile Bakterium *Thermus thermophilus* und das Archaeon *Thermoproteus tenax* dar, die primär Trehalose anreichern [NUNES et al, 1995; AHMED et al., 2004]. Vermutlich hängt dies mit der Tatsache zusammen, dass der überwiegende Teil der cytosolischen Proteine hyperthermophiler Organismen nach außen negativ geladen ist, so dass sich Solut und Protein gegenseitig abstoßen und einander ausgrenzen [ARAKAWA & TIMASHEFF, 1990].

Di-*myo*-Inositol-1,1-Phosphat (DIP) [8] ist das am weitesten verbreitete kompatible Solut hyperthermophiler Archaea. Erstmals wurde es in *P. woesei* [SCHOLZ et al., 1992] und *Methanococcus igneus* [CIULLA & SANTOS, 1994] und später auch in anderen Hyperthermophilen wie *Pyrodictium occultum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermococcus celer* und *Pyrolobus fumarii* [MARTINS et al., 1997; LAMOSA et al., 1998] identifiziert. In all diesen Organismen wird DIP erst in hohen Konzentrationen akkumuliert, wenn die Temperatur über dem Wachstumsoptimum liegt, wie bei *P. furiosus* bei einem Wachstum über 101°C [MARTINS & SANTOS, 1995]. Der offensichtlichen thermoadaptiven Bedeutung dieser Substanz wird durch die in unserer Ar-

beitsgruppe von Prof. Dr. Hensel bevorzugte Bezeichnung „thermokompatible Solute“ Rechnung getragen.

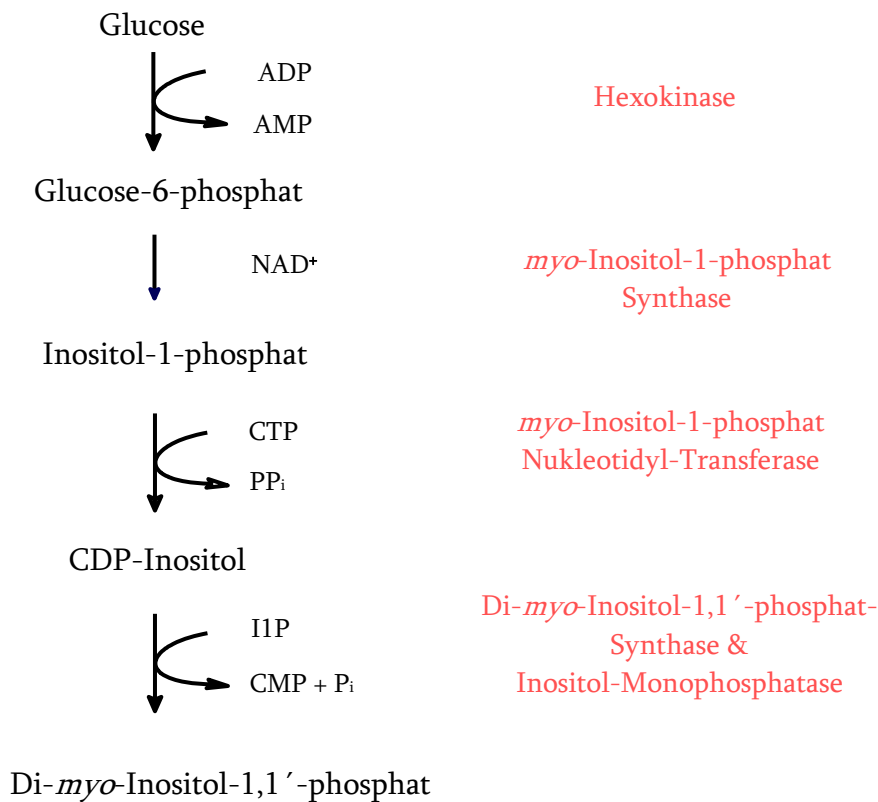


Abb. 1.4.: Postulierter Biosyntheseweg des Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphats in *Pyrococcus woesei* [nach WOLFF, Dissertation 2001]

Anwendung finden kompatible Solute sowohl im Kosmetik- als auch im Pharmabereich. Die weitere Forschung in diesem Bereich konzentriert sich darauf, die bisher noch nicht verstandenen Mechanismen der Stabilisierung von Biomolekülen aufzuklären, die Produktionsverfahren zu verbessern und die Regulation der Biosynthese aufzuklären. Basierend auf den Untersuchungen aus Rohextrakten von *P. woesei* [SCHOLZ et al., 1992] und Wolff [Dissertation, 2001], konnten bis dahin folgende Ergebnisse zur DIP-Biosynthese erzielt werden. Demnach verläuft der DIP-Syntheseweg wie folgt (Abb. 1.4.): Glukose-6-phosphat (G6P) [9] wird durch eine Inositol-1-phosphat Synthase (IPS) in Inositol-1-phosphat [10] überführt. Dieses Intermediat wird durch eine Inositol-1-phosphat-Monophosphatase dephosphoryliert und anschließend mit CTP [26] durch die CTP:Inositol-1-phosphat-cytidylyl-Transferase aktiviert. Aus der aktivierten Vorstufe und eines weiteren Moleküls Inositol-1-phosphat synthetisiert die Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat-Synthase (DIPS) schließlich DIP [8]. Die Enzyme IPS und IMP konnten heterolog exprimiert und die Aktivität der DIPS mittels Ionenchromatographie nachgewiesen werden [SCHOLZ et al., 1998; CHEN et al., 1998].

## 1.4 Produktion von DIP

Für die Produktion von DIP im Gramm-Maßstab kommt bislang nur die Biosynthese durch hyperthermophile Archaea in Frage. Aufgrund der zu erwartenden hohen DIP-Ausbeuten und der relativ einfachen Fermentationsbedingungen bieten sich Vertreter der Gattung *Pyrococcus* (Abb. 1.6) als Produktionsstämme an.



Abb. 1.5.: Heiße Schwefelfelder (Solfataren) in Italien (Vulcano) mit Temperaturen von bis zu 100°C. (Foto: TUHH).

*Pyrococcus* Arten sind hyperthermophile Organismen der Ordnung Thermococcales mit einer optimalen Wachstumstemperatur von ca. 100 °C. Alle Arten sind chemoorganotroph und produzieren Wasserstoff oder in Gegenwart von elementarem Schwefel auch Schwefelwasserstoff. *P. woesei* und *P. furiosus* wurden beide am Strand von Porto di Levante auf der Insel Vulcano in Italien aus geothermal erhitzten Sedimenten isoliert (Abb. 1.5) [FIALA & STETTER, 1986].

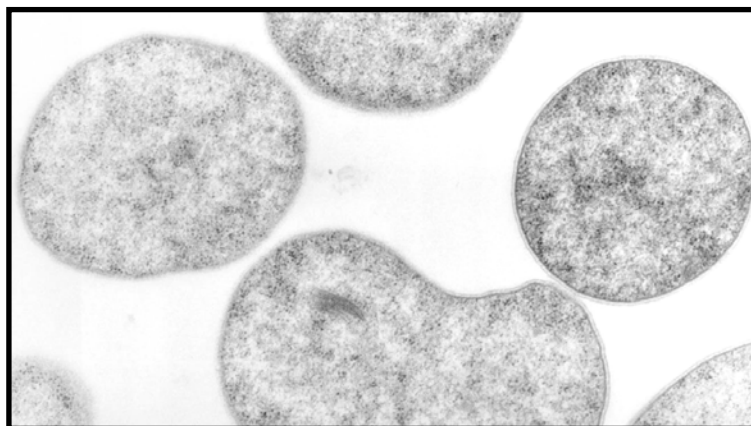


Abb. 1.6.: Elektronenmikroskopische Aufnahme des *P. furiosus* von H. C. Aldrich, Universität Florida.

Beide Arten zeigen hohe morphologische und physiologische Übereinstimmungen. Die Organismen sind polytrich begeißelt, sphärisch geformt und haben einen Durchmesser von 0,8 bis 2  $\mu\text{m}$ . Das pH-Optimum für das Wachstum verläuft flach zwischen pH 6 und pH 8. Die optimalen Konzentrationen an Salz liegen zwischen 15 und 35  $\text{gl}^{-1}$  NaCl. Unter optimalen Wachstumsbedingungen weisen beide Arten eine minimale Verdopplungszeit von 37 min auf und produzieren  $\text{H}_2$  in Anwesenheit von Maltose in  $\text{S}^\circ$ -freiem Medium. Jedoch zeigt *P. woesei* eine stärkere Autolyse in der stationären Phase als *P. furiosus* [KRAHE et al., 1996].

### 1.5 Aufgabenstellung

Kompatible Solute bilden einen generellen Schutzmechanismus für Zellen gegen Stressfaktoren wie Kälte, Hitze, Salz, UV-Strahlung oder freie Radikale. Im Rahmen des Zukunftswettbewerbs Ruhrgebiet (Projekt "Heisse Biochemie") wurde mit der Firma bitop (Gesellschaft für biotechnologische Optimierung AG) angestrebt weitere innovative Produkte aus Extremophilen zu entwickeln. Das allgemeine Konzept "Stressschutz durch Kompatible Solute" soll intensiv erforscht und zum Nutzen des Menschen angewendet werden. Die zukünftigen Anwendungen sollten dabei hauptsächlich in den Bereichen Hautschutz, Dermatologie, Onkologie und Diagnostik liegen.

Zu Beginn dieser Arbeit sollte daher bei der Firma bitop AG ein Downshiftprozess zur Produktion von Di-*myo*-Inositol-1,1-phosphat [8] im Gramm-Maßstab entwickelt werden. Diesem Zweck diene die Etablierung einer Anlage, die eine kontinuierliche Kultivierung von *P. furiosus* in einem Chemostat erlaubt. Für eine effiziente Gewinnung von DIP sollte ferner die Konstruktion eines rekombinanten DIP-Produzenten wie z.B. *E. coli* angestrebt werden. In dieser Arbeit wurde daher versucht die fehlenden Enzyme des DIP-Syntheseweges aus *P. woesei* zu identifizieren und ihre kodierende Sequenz in *E. coli* zu exprimieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid-Bisacrylamid (37.5:1) 30%	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Agarose Ultrapure	Life Technologies, Eggenstein
Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Antibiotika	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bacto-Pepton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Coomassie-Brilliant-Blue R und G	Serva GmbH, Heidelberg
Cystein/Cystein Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Cytochrom C aus Rinderherz	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Cytidindiphosphat (CDP)	Gerbu Biotechnik GmbH, Geiberg
Cytidinmonophosphat (CMP)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Cytidinmonophosphormorpholidat (CMP-M)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Cytidintriphosphat (CTP)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Polymerase aus <i>P. furiosus</i>	Life Technologies, Eggenstein
dNTP Mix	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ferritin aus Pferdemiß	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Filterpapiere Whatman 3 MM	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Aplichem
Glucose-6-Phosphat	Hartmann
Glucose-6-Phosphat <sup>14</sup> C	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Hefeextrakt	Gerbu Biotechnik GmbH, Geiberg
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG-b)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
L-Laktat Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Maltose Monohydrat (Grad II)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Molekularmassenstandard SDS-7H	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Molekularmassenstandard #SM0671	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Molekularmassenstandard #SM0661	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Natriumhydroxidlösung (50%ig)	VWR International AG, Dietikon, Schweiz



## 2. MATERIAL UND METHODEN

Oligonucleotide für PCR, Sequenzierung	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Proteinase K	VWR International AG, Dietikon, Schweiz
Problott-Membran (PVDF)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pyruvat Kinase aus Kaninchenmuskel	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
QIAGEN Plasmid-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Rinderserumalbumin	Sigma Chemie, München
RNase A	VWR International AG, Dietikon, Schweiz
Siedegewerbesalz 6C2B1, fein	Akzo Nobel, Hamburg
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Tri- <i>n</i> -Octylamin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in p. a. Qualität von den Firmen VWR-International (Darmstadt), Fluka (St.Gallen), Serva (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Difco (Stuttgart), Gerbu (Geiberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Trypticase-Pepton wurde von Becton Dickinson (Cockeysville) verwendet. Enzyme und Coenzyme stammten von Roche Diagnostics (Mannheim) oder Aplichem (Darmstadt). Alle organischen Lösungsmittel stammten von J. T. Baker B. V., Deventer, Niederlande.

## 2.2 Geräte

Chemilumineszenz-Detektor	ChemiDoc Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Chromatographieanlagen	BioLogic DuoFlow Pathfinder 20 system (Bio- Rad Laboratories GmbH, München)  HPLC: Pumpe 420, (Kontron Instruments, Neufahrn bei München) Gradientenformer 425, Kollektor Frac-Gradientenformer 425, Detektor 432 Kollektor Frac-100 Standardchromatographie (Pharmacia LKB, Freiburg) mit Minipuls 3 Schlauchpumpen (Abimed, Langenfeld) IC: Autosampler ASI-100, DX500 (Dionex GmbH, Idstein) bestehend aus Eluentorganizer EO1, Gradientenpumpe GP 40, Elektrochemischer Detektor ED 40, amperometrische Messzelle mit Gold-, Arbeits- und Referenzelektrode, UV-Vis vier Wellenlängendetektor
Chromatographiesäulen	Leersäulen: C16/20, C26/40, C26/100 (Pharmacia LKB, Freiburg) Fertigsäulen: HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Superose 6 (Pharmacia LKB, Freiburg)
Dampfsterilisator	Webeco Modell H (Webeco GmbH, Bad Schwartau)
Durchlaufzentrifuge	Separator TA 1-01-525 (Westfalia SeparatorAG, Oelde)
Elektrophoresekammern für Agarose-Gelelektrophorese	Agagel Mini (Biometra GmbH, Göttingen); Eigenbau der Feinmechanik Universität Duisburg-Essen)
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Minigel-Twin (Biometra GmbH i. L., Göttingen)
Fermenter	Biostat <sup>®</sup> 100 L Fermenteranlage (Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen) 42 L Laborpilotfermenter Typ LP351 (Bioengineering AG, Wald, Schweiz)
Querstrom-Filtrationseinheit Hochdruckpresse für	Pellicon (Millipore GmbH, Eschborn) French Press (SLM Aminco Instruments

Zellaufschluss	Inc., Vertrieb der Firma Sopra, Büttelborn)
Inkubatoren	RFI-125 Inkubator (Infors AG, Bottmigen, Basel, Schweiz); Certomat H/Certomat R (Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen)
Kryostat	Huber CC240 (Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg); Julabo® FP88-HL (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)
Mikroskope	Olympus BH-2 RFCA (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg); Olympus CHT (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg); Leitz Laborlux S (Leitz)
Photometer	Eppendorf 1101M, thermostatisierbares UV/VIS Photospektrometer (Eppendorf AG, Hamburg)
Plattenwärmetauscher	Plattenwärmetauscher GC 030P (SWEP Wärmetauscher Deutschland AG, Hildesheim)
Pumpen	Watson-Marlow 101U und 505U (Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen)
Thermocycler	iCycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Vakuum-Zentrifuge	Speedvac Concentrator (Savant, Farmindale, GB)
Zentrifugen	Ultrazentrifuge L8-80 (Beckman Coulter# GmbH, Krefeld); Großzentrifuge Avanti J25 (Beckmann, München); Tischzentrifuge Sigma 3K12 (Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen)

### 2.3 Organismen

*Pyrococcus woesei*; DSM 3773 [ZILLIG, 1988]

*Pyrococcus furiosus*; DSM 3638 [FIALA & STETTER, 1986]

*Escherichia coli*; K12 Stamm DH5 $\alpha$ ; DSM 6897 [HANAHAN, 1983]

*Escherichia coli*; Rosetta(DE3); Firma Novagen [Novagen]

*Escherichia coli*; Rosetta(DE3) pLysS; Firma Novagen [SUDIER & MOFFATT, 1986]

*Escherichia coli*; One Shot TOP10; Firma Novagen [GRANT et al., 1990]

## 2.4 Anzucht der Organismen

Sowohl *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) als auch *Pyrococcus woesei* (*P. woesei*) wurden in Glasflaschen (250 ml Schott-Flaschen mit Butylstopfen verschlossen) und in Fermentern mit Komplexmedium unter anaeroben Bedingungen [modifiziert nach RAVEN et al, 1992] kultiviert (Tabelle 2.1). Um Maillard-Reaktionen [BELITZ & GROSCH, 1992] auszuschließen, wurden Aminosäure- und Ammonium-haltige Lösungen separat von der jeweiligen Kohlenstoffquelle Maltose (6,5 g/l), Malzextrakt (6,5 g/l) oder löslicher Stärke (10 g/l) autoklaviert.

### 2.4.1 Batch-Fermentation von *P. woesei* und *P. furiosus*

*P. woesei* und *P. furiosus* wurden in einem 30 oder 100 l Fermenter unter anaeroben Bedingungen bei 98°C und pH 6,8 kultiviert. Die Fermenter wurden mit 1 l einer Vorkultur ( $2 \times 10^8$  Zellen/ml) beimpft und über Nacht kultiviert (Rührerdrehzahl 250 Upm, Gasfluss  $N_2/CO_2$  0,8 m<sup>3</sup>/h). Änderungen der Zellzahl wurden mit einer Helber-Zählkammer (Ochs, Bovenden) mikroskopisch verfolgt. Vor der Zellernte wurde ein Aliquot von 2 l Kulturflüssigkeit entnommen und bis zur Weiterverwendung als Vorkultur bei 4°C gelagert. Die restliche Kulturflüssigkeit wurde über einen Plattenwärmetauscher zunächst auf 10°C abgekühlt. Nach einer ca. 20fachen Aufkonzentrierung mit Hilfe einer Querstrom-Filtriereinheit (Pellicon, Millipore) wurde die Zellsuspension bei 10.000 x g zentrifugiert (15 min, 4°C) und das Zellpellet bei -80°C gelagert.

**Tabelle 2.1.: Medium für *Pyrococcus* spc. nach Raven [RAVEN et al., 1992] modifiziert.**

<u>Grundmedium für 1l:</u>		<u>Magnesiumsalze (1l):</u>	
NaCl	28 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	180 g
Magnesiumsalze	10 ml	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	140 g
Lösung A	1 ml	<u>Lösung A (1l):</u>	
Lösung B	1 ml	Mn(II)SO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	9 g
Lösung C	1 ml	Na <sub>3</sub> Citrat	4 g
Lösung D	1 ml	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(II) SO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10 g
Hefe	1 g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5 g
Trypton	2 g	Cu(II) SO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,15 g
Resazurin	1 ml	KAl SO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	0,3 g
Cystein/HCl	0,5 g	Co(II)Cl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,3 g
		Ni(II)Cl <sub>2</sub>	2,5 g
<u>Kohlenhydrate wahlweise:</u>		<u>Lösung B (1l):</u>	
Maltose	6,5 g	Fe(II)Cl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O in 1 M HCl	10 g
Malzextrakt	6,5 g		
Stärke (löslich)	10 g		
<u>Lösung C (1l):</u>		<u>Lösung D (1l):</u>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 g	CaCl x 2 H <sub>2</sub> O	56 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	3,3 g	KCl	16 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7,5 g	SrCl x 6 H <sub>2</sub> O	4 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g	NaBr	25 g
NaSeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,005 g	KJ	10 g

### 2.4.2 Kontinuierliche Fermentation von *P. furiosus* zur Produktion von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (DIP)

Die Fermentationsanlage zur Produktion von Di-*myo*-inositol-1,1'-phosphat [8] ist vereinfacht in Abb. 3.1 Seite 38 dargestellt. Kernbestandteil ist ein sterilisierbarer Laborpilot-Fermenter Typ LP351 mit einem nutzbaren Volumen von 30 Litern der Firma Bioengineering und einer dazugehörigen Steuer- und Regeleinheit. Die abgewogenen Chemikalien wurden zunächst in 5 l Gesamtvolumen nacheinander gelöst, der pH-Wert mit 5 M NaOH auf pH 6,8 bei RT eingestellt und die Lösung im Fermenter auf 30 l mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Danach wurde es mit Cystein/HCl 0,5 g/l reduziert und mit Packgas (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 70/30) durchgast. Während der gesamten Fermentation betrug die Begasungsrate 0,8 m<sup>3</sup>/h. Nach Erreichen einer Zellzahl von 1 x 10<sup>10</sup> Zellen/ml (entspricht einer Feuchtzellmasse von ca. 1,2 g/l) wurde mit der kontinuierliche Fermentation begonnen. Frische Salzlösung, Pepton/Hefe und Malzextrakt wurden steril über eine Pumpe zugeführt. Über ein Steigrohr wurden das Reaktionsvolumen des Fermenters und dadurch die Teilungsrate des Organismus geregelt. Die durch den Überlauf gewonnene Kulturflüssigkeit wurde durch einen Kryostaten auf ca. 4°C gekühlt und kontinuierlich über einen Separator (Firma Westfalia) geerntet. Die so gewonnenen Feuchtzellen wurden für die spätere DIP-Extraktion bei -80°C eingefroren.

### 2.4.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in zuvor autoklaviertem flüssigen LB-Medium (1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl). Für die Herstellung von festem Medium wurde 1,5% Agar zugesetzt. Für eine optimale Sauerstoffversorgung wurden kleine Flüssigkulturen (2-400 ml) bei 220 Upm im Inkubator geschüttelt. Bei größeren Anzuchten bis zu 17 l Kulturvolumina wurden die Ansätze mit sterilfiltrierter Pressluft bei einer Rate von 50 l/min begast. Antibiotika wurden entsprechend den Plasmid codierten Resistenzen in Konzentrationen von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 34 µg/ml Chloramphenicol eingesetzt. Der *E. coli* Stamm DH5α wurde zur Etablierung von Plasmiden und Gewinnung von Plasmid DNA genutzt. Die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen erfolgte in *E. coli* Rosetta(DE3). Dabei wurde LB-Medium mit 1% einer Vorkultur inokuliert. Bei einer optischen Dichte (578 nm) von 0,6 bis 0,8 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG die Expression des Proteins über den T7-Promotor induziert und die Inkubation für weitere drei Stunden fortgesetzt. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis wurde die Zellsuspension bei 6500 x g für 15 min abzentrifugiert und anschließend das Pellet bei -80°C gelagert.

## 2.5 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

### 2.5.1 Isolierung von genomischer DNA aus *P. woesei* und *P. furiosus*

Die Präparation genomischer DNA aus *P. woesei* und *P. furiosus* wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Weil [WEIL et al., 1988] nach einer Modifikation von Meakin [MEAKIN et al., 1991] durchgeführt. Hierbei wurde 1 g tiefgefrorener Zellen unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff zermörsert. Nach Aufnahme in 10 ml Aufschlusspuffer (250 mM Saccharose, 10 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 1% SDS) wurden 100 µg/ml Proteinase K zugegeben und die Zelltrümmer abzentrifugiert (37.000 x g, 15 min, 4°C). Durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Isopropanol und anschließender Inkubation bei -20°C für 30 min wurde die DNA aus der Lösung gefällt. Durch Zentrifugation wurde die DNA pelletiert und über Nacht schonend in 5 ml Inkubationspuffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Durch RNase-Verdau (100 µg/ml, 60 min, 37°C) sowie eine Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA gereinigt. Nach Zugabe von 1/5 Volumen NH<sub>4</sub>-Acetat [10 M] und Ethanol bei -20°C für 30 min wurde die DNA pelletiert (20.000 x g, 20 min, 4°C), zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 400 µl A. bidest aufgenommen.

### 2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### 2.5.2.1 Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse

Plasmid-DNA zur Restriktion und Klonierung wurde mittels alkalischer Lyse isoliert [BIRNBOIM & DOLY, 1979]. Dabei wurden 1-2 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (12.000 x g, 5min) und das Zellpellet in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8, 100 µg/ml RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl frisch angesetztem Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) und anschließender Inkubation von 5 min bei RT wurden die Zellen lysiert. Die Fällung der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 300 µl eiskaltem Puffer 3 (3 M K-Acetat, pH 4,8) und anschließende Inkubation von 20 min auf Eis. Nach Entfernung der genomischen DNA durch Zentrifugation (20.000 x g, 15 min, 4°C) wurde die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol (10 min, RT) aus dem Ansatz gefällt, anschließend pelletiert (20.000 x g, 15 min, 4°C) und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde unter Vakuum vollständig getrocknet und in 50 µl A. bidest aufgenommen.

#### 2.5.2.2 QIAGEN-Plasmid-Präparation

Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Midi-Plasmid Kit der Firma QIAGEN präpariert. Dabei wurden Kulturvolumina von 25 ml (high-copy Plasmide) bzw. 50 ml (low-copy Plasmide) verwendet.

### 2.5.2.3 Schnellpräparation von Plasmid-DNA („boiling-prep“)

Zur schnellen qualitativen Analyse von rekombinanten *E. coli*-Klonen konnte mittels dieser Methode aus Einzelkolonien Plasmid-DNA zur PCR-Amplifikation gewonnen werden. So war ein schnelles Screening von Klonen ohne vorherige Anzucht möglich. Die Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agar-Platte gepickt. Ein Teil der Zellen wurde auf einer weiteren Platte ausgestrichen, der Rest in 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7 resuspendiert. Nach Lyse der resuspendierten Zellen durch Inkubation bei 94°C für 5 min und anschließender Zentrifugation (14.000 x g, 1 min) wurden 5 µl des Überstandes direkt als Template für die PCR eingesetzt.

### 2.5.3 DNA-Konzentrierung

Zur Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen wurde die DNA mit Isopropanol als Fällungsmittel präzipitiert [SAMBROOK et al., 1989]. Die Fällung erfolgte mit 0,7 Volumen Isopropanol für 10 min bei RT. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (20.000 x g, 15 min, 4°C) pelletiert, mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und in einer adäquaten Menge A. bidest aufgenommen.

### 2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen diente der Größen- und Mengenabschätzung von genomischer DNA, Plasmid-DNA und PCR-Produkten sowie der präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten [SAMBROOK et al., 1989]. Die Gele enthielten 1 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,5; 1 mM EDTA). Zur Visualisierung der DNA wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA-Helix und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm).

### 2.5.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Dabei entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssDNA [SAMBROOK et al., 1989]. Das Verhältnis von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  ergibt den Reinheitsgrad der DNA: Hinreichend saubere DNA-Präparationen haben ein Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  von 1,8 oder größer.

### 2.5.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

#### 2.5.6.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

PCR-Fragmente, die nach PCR-Amplifikation oder nach Restriktionsverdau anfielen, wurden über eine präparative Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Das gewünschte Fragment konnte danach auf dem UV-Schirm mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten werden. Dabei musste so schnell wie möglich ge-

arbeitet werden, da DNA durch Einstrahlung von UV-Licht zerstört wird. Die isolierten DNA-Gelstücke wurden danach über das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) oder NucleoSpin Extract Kit (Macherey Nagel, Düren) nach Anleitung der Hersteller aufgereinigt.

### 2.5.6.2 Reinigung von PCR-Fragmenten

Für die Reinigung von PCR-Fragmenten direkt aus dem Amplifikationsansatz wurde der QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers genutzt. Bis zu 10 µg DNA konnten dabei an eine Kieselgel-Säule adsorbiert werden. Nach einem anschließenden Waschschriff mit PB Puffer (enthält Guanidinhydrochlorid und Isopropanol) wurde die DNA nacheinander mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 und A. bidest eluiert. Reste von Isopropanol aus dem Waschpuffer wurden unter Vakuum entfernt.

### 2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion [MULLIS et al., 1986] ist eine Technik zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Das Procedere verläuft nach folgenden Schritten:

**Denaturierung:** Aufschmelzen einer dsDNA (Template) bei 94°C in zwei Einzelstränge;

**Annealing:** Anlagerung von zwei begrenzenden Oligonukleotid Primern;

**Elongation:** Verlängerung der Primer in 5' - 3' -Richtung durch komplementäre Anlagerung von Nukleotiden mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase.

Der aus den Schritten 1-3 bestehende Zyklus wird 25-30fach wiederholt.

Für die Bestimmung der Annaelingtemperatur von Oligonucleotiden < 20 bp wurde der Schmelzpunkt nach folgender Faustregel berechnet [THEIN & WALLACE, 1986]:

$$T_m = (\% \text{ AT}) \times 2 + (\% \text{ GC}) \times 4$$

#### 2.5.7.1 Amplifikation von genomischer DNA und Plasmid-DNA mittels PCR

PCR-Amplifikationen wurden mit 50-100 ng Template-DNA und je 1 µM Primer in einem Reaktionsvolumen von 25 bis 100 µl durchgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt 200 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und einen für die unterschiedlich verwendeten DNA-Polymerasen entsprechenden Puffer. Die DNA-Polymerase wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt, in den meisten Fällen 1 U Enzym pro 25 µl Ansatz.



### 2.5.7.2 PCR-Mutagenese

Zur Klonierung von Genen mit Hilfe der Vektoren pET 11c und pET 15b wurden unmittelbar vor und hinter dem Leserahmen des Gens Restriktionsschnittstellen mittels ortsgerichteter Mutagenese eingefügt. Dazu wurden in der PCR mutagene Primer eingesetzt, die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen erzeugen, welche außerhalb des Leserahmens schneiden. Um die Fehlerrate bei der Amplifikation zu minimieren, wurde eine DNA-Polymerase mit einer zusätzlichen 3'-5'-Exonukleaseaktivität ("proofreading"-Aktivität) verwendet. Vornehmlich wurde die *Pwo*-Polymerase eingesetzt.

### 2.5.8 Enzymatische Modifikationen von DNA

#### 2.5.8.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von genomischer DNA und Plasmid-DNA erfolgte mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Angaben der Hersteller. Dabei wurden 2-3 U Enzym/ $\mu$ g DNA eingesetzt und 2-4 Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

#### 2.5.8.2 5'-Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Bei der Ligation ist die Rezirkularisierung des linearisierten Vektors gegenüber der Insertion der Fremd-DNA begünstigt. Um dies zu verhindern, wurden die endständigen 5'-Phosphatreste der restringierten Vektor-DNA durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) entfernt. Nach Restriktion wurde 1  $\mu$ l alkalische Phosphatase zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach beendeter Reaktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

#### 2.5.8.3 Ligation

Um DNA-Fragmente in Plasmide zu integrieren, wurde restringierte Fremd-DNA mit restringierter und dephosphorylierter Vektor-DNA mittels T4 Ligase verknüpft. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiestern zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA. Fremd-DNA und Vektor-DNA wurden zunächst in einem Verhältnis von 3:1 (bezogen auf äquimolare Mengen) in einem Volumen von 8  $\mu$ l gelöst und 5 min bei 45°C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen aufzulösen. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l 10 x Reaktionspuffer (400 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8) und 1  $\mu$ l T4 Ligase (1 Weiss-Unit/ $\mu$ l) erfolgte die Ligation über Nacht bei 4°C. Die Ligation wurde durch Hitzeeinwirkung (70°C, 10 min) beendet. Der Ligationansatz wurde sofort zur Transformation kompetenter Zellen eingesetzt.

### 2.5.9 Transformation

#### 2.5.9.1 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zellen der *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  und Rosetta(DE3) wurden mit RbCl und CaCl<sub>2</sub> behandelt [PROMEGA TECHNICAL MANUAL, 1994], um die Aufnahme von Fremd-DNA zu erhöhen. Dafür wurden 0,2 ml einer Übernachtskultur in 20 ml frischem LB-Medium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,3 bis 0,5 angezogen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 2300 x g, 4°C wurden die Zellen in 10 ml eiskalter Lösung A (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, pH 7) resuspendiert und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter Lösung B (100 mM MOPS, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, pH 6,5) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 700 x g, 15 min und 4°C wurden die kompetenten Zellen vorsichtig in 2 ml eiskalter Lösung B resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Für jede Transformation wurden frisch präparierte kompetente Zellen herangezogen.

#### 2.5.9.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Transformationen unterschiedlicher *E. coli* Stämme wurden sowohl mit Ligationssansätzen als auch mit präparierten Plasmiden durchgeführt. Die Ansätze wurden mit 200  $\mu$ l kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt und 60 min oder länger auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec durchgeführt und danach für 5 min auf Eis abgekühlt, um die Poren in der Zellwand zu schließen. Die Zellen zog man anschließend für 1 h bei 37°C im Schüttler an. 100 und 900  $\mu$ l der Zellsuspension wurden auf selektiven Antibiotikaplatten ausplattiert.

#### 2.5.9.3 Identifikation rekombinanter Klone durch Antibiotikaresistenz und „boiling PCR“

Je 10 Kolonien der transformierten *E. coli*-Kulturen wurden für die „boiling“-PCR verwendet. Dazu wurden die Kolonien steril gepickt und in 50  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl pH 7 aufgenommen. Nach Inkubation für 5 min bei 95°C wurde der Ansatz zentrifugiert (13.000 x g, 1 min, RT). Zur Kontrolle des Inserts wurden 10  $\mu$ l des Überstands in eine Standard-PCR mit Vektor-Primern eingesetzt.

### 2.5.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen [SANGER et al., 1977] wurden vom DNA-Sequenzierservice der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen mit einem ABI-Prism-377 Sequencer durchgeführt.

### 2.5.11 Computergestützte Auswertung von Nucleotidsequenzen

Zur Analyse von Sequenzdaten, Auffinden von Restriktionsschnittstellen und Durchführung von Alignments wurde folgende Computer Software verwendet (Tabelle 2.2.)

**Tabelle 2.2.: Computer Software**

Software	Referenz	Anwendung
CHROMAS	McCarthy, unveröffentlicht	Visualisierung von Sequenzchromatogrammen auf dem PC
GENMON 4.4	Gesellschaft für Biotechnische Forschung mbH, Braunschweig	Restriktionsanalysen, Bestimmung des Codon-Gebrauchs, Übersetzung von DNA- in Aminosäuresequenzen
BLAST 2.0	Altschul et al., 1997 ( <a href="http://www.ncbi.nih.nlm.gov/blast">www.ncbi.nih.nlm.gov/blast</a> )	Datenbankvergleiche von DNA- und Proteinsequenzen
Clustal W 1.7	Tompson et al., 1994	Alignments von DNA- und Proteinsequenzen

## 2.6 Analytik und Präparation niedermolekularer Komponenten

### 2.6.1 Ionenchromatographie

Zur Trennung und Detektion von niedermolekularen Substanzen wurde die HPAEC-PAD Technik (High pH Anion Exchange Chromatographie with Pulsed Amperometric Detektion) verwendet. Als stationäre Phase wurde die CarboPac PA 10 mit einer AminoTrap als Vorsäule (DIONEX) eingesetzt.

### 2.6.2 Herstellung der Eluenten

Eluent A, 100 mM NaOH:

1989,6 ml A. bidest wurden 15 min mit Helium 4.6 durchgast. Danach wurden 10,6 ml einer 50%igen NaOH-Lösung dazupipettiert und für weitere 5 min entgast.

Eluent B, 100 mM NaOH mit 1M Natriumacetat:

2 l einer 1.005 M Natriumacetatlösung wurden über einen Natriumacetatfilter (0,2 µm) sterilfiltriert und 1989,6 ml dieser Lösung mit Helium 15 min entgast. Danach wurden 10,6 ml einer 50%igen NaOH-Lösung dazu pipettiert und für weitere 5 min entgast.

### 2.6.3 Probenvorbereitung

Zur Entfernung von Protein wurden die Proben zuvor mit 20%iger eiskalter Trichloressigsäure versetzt, auf Eis für 1 h inkubiert und anschließend bei 20.000 x g, 4°C, 15 min abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit 10 M KOH neutralisiert. Zur Analyse wurden 20 µl auf die Säule injiziert.

### 2.6.4 Gerätekonfiguration und Elutionsbedingungen

Die chromatographische Einheit besteht aus einer AminoTrap, CarboPac PA10, einer Gradientenpumpe GP40, einem Detektor ED40, der amperometrischen Zelle, dem Vierwellenlängen UV-Detektor UVD 170U und dem Autosampler ASI-100 (DIONEX). Es wurden 20 µl Probe (auf 4°C gekühlt) über den Autosampler injiziert. Diese Injektion setzte automatisch die Gerätekaskade des DX500 in Gang. Der Detektor arbeitet in einem Detektionsbereich von 50 nC und führte nach dem Start automatisch ein Offset durch. Die Elution der Solute wurde bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1 ml/min und die Trennung bei konstanter NaOH Konzentration (100 mM) durch einen linearen Gradienten bis 250 mM Natriumacetat in 15 min durchgeführt. Die Endkonzentration wurde dann für 5 min konstant gehalten. Zur Regeneration der Säule wurde diese für 5 min mit 800 mM Natriumacetat gespült und anschließend mit 100 mM NaOH aquilibriert.

### 2.6.5 Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren erfolgte mit den Spektrometern DPX-300 und DRX-500 der Firma Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe; die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren sind  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelt (75.5, 125.7 MHz) und die  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren wurden  $^1\text{H}$ -breitbandgekoppelt und -entkoppelt (121.5 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in  $\delta$ -Werten angegeben und auf  $\text{D}_2\text{O}$  ( $^1\text{H}$ -NMR) als internen bzw.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $^{31}\text{P}$ -NMR) als externen Standard bezogen. Die Analysen wurden durchgeführt von Herrn Bandmann, Organische Chemie, Universität Duisburg-Essen.

### 2.6.6 Herstellung von *myo*-Inositol-1-phosphat

*myo*-Inositol-1-phosphat [10] wurde mit Hilfe der rekombinanten IPS von *P. woesei* aus Glucose-6-Phosphat [9] hergestellt [WOLFF Dissertation, 2001]. Zur Isolierung der rekombinanten IPS wurden dazu 23 g des Expressionsklons *E. coli* BL21DE3 pET11c+IPS in Aufschlusspuffer (100 mM Hepes, pH 7,6) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch die French Press (90 bar) aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Ultrazentrifugation (80.000 x g, 1 h, 4°C) abgetrennt und der Überstand für 30 min bei 90°C hitzegefällt. Ein Großteil der *E. coli* eigenen Proteine konnte so präzipitiert werden. Nach erneuter Zentrifugation (47.900 x g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand über Nacht gegen 100 mM Hepes,

pH 7,6 dialysiert. 60 ml der Proteinlösung wurden mit 865 mg Glucose-6-phosphat [9] (pH 7) und 400 mg NAD<sup>+</sup>, gelöst in 100 mM Hepes pH 7, versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 85°C wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und das Protein mit 160 ml eiskaltem Ethanol gefällt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und im Rotationsverdampfer bei 37°C im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der farblose Feststoff wurde in 10 ml A. bidest aufgenommen. Das Rohprodukt wurde auf eine mit A. bidest äquilibrierte 100 ml DEAE-Sephadex mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Nachfolgend wurde zuerst mit 400 l A. bidest und anschließend mit mehreren Stufen je 100 ml bis 100 mM KCl eluiert. Die I-1-P-haltigen Fraktionen wurden über Ionenchromatographie analysiert. Die gepoolten Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer bis auf 10 ml eingengt und die Lösung über einer Sephadex G10 Gelfiltrationssäule entsalzt.

### 2.6.7 Herstellung von Cytidin-5'-diphosphat-*myo*-Inositol

446 mg 4-Morpholin-N,N'-Dicyclohexylcarboxamidinium Cytidin-5'-Phosphoromorpholidat [13] wurden unter trockenem Argon mit 15 ml absolutem Pyridin versetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 30°C im Vakuum abdestilliert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Separat wurde eine wässrige Lösung des Kalium-Inositol-1-phosphat [10] über eine Dowex-50 Ionenaustauschersäule (H<sup>+</sup>-Form, 1 x 10 cm) gegeben. Nach gründlichem Spülen mit 75 ml A. bidest wurde die freie Säure im Rotationsverdampfer auf 2,6 ml eingengt, die Lösung mit Pyridin alkalisiert und mit 860 µl tri-*n*-Octylamin versetzt. Diese Lösung wurde bis zur Trockene unter Vakuum bei 30°C eingengt. Der Rückstand wurde unter trockenem Argon in 20 ml Pyridin aufgenommen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Zu dem so getrockneten L-*myo*-Inositol-1-Phosphat [10] wurde dann unter trockenem Argon das vorbereitete Cytidin-5'-phosphoromorpholidat [13], gelöst in 30 ml abs. Pyridin, pipettiert. Das Lösungsmittel wurde noch einmal bei 30°C im Vakuum abdestilliert, der Ansatz in 40 ml abs. Pyridin aufgenommen und fünf Tage bei Raumtemperatur unter trockenem Argon gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel bei 30°C im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in 40 ml einer Natriumacetat-haltigen Lösung resuspendiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 30 ml Diethylether extrahiert. Die gepoolte organische Phase wurde einmal mit 30 ml A. bidest nachgewaschen und die wässrigen Phasen wurden im Rotationsverdampfer auf 8 ml eingengt. Das Entsalzen geschah über eine 1 l Sephadex G10 Gelfiltrationssäule (3,6 cm x 100 cm) [WOLFF Dissertation, 2001].

### 2.6.8 Extraktion und Reinigung von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (DIP) im Technikumsmaßstab

Die Aufreinigung von DIP [8] wurde von den Mitarbeitern der Firma bitop in Witten durchgeführt. 350 g lyophilisierte *P. furiosus* Zellen wurden mit 2,5 l 70%igen Ethanol versetzt und bei 90°C 22 Stunden extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde der Suspension 2,5 l A. bidest zugegeben und 20 min gerührt. Das Zellpellet wurde abzentrifugiert und in 2,5 l A. bidest eine Stunde resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden beide Überstände vereinigt und im Rotationsverdampfer auf ca. 500 ml konzentriert. Die Lösung wurde zweimal mit je 200 ml Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Rotationsverdampfer auf 200 ml eingengt. Das Produktgemisch enthielt zu gleichen Anteilen DIP und Firoin (Mannosylglycerat [4]). Über Elektrodialyse und Ionenchromatographie wurden beide Substanzen voneinander getrennt. 2 l 35 gramhaltige DIP-Lösung wurde mit 120 ml/min auf eine QAE-Sephadex A25 (11 cm x 45 cm; Pharmacia) aufgetragen und mit 2 l A. bidest nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 mM NaHCO<sub>3</sub>. Es wurden 2 l Fraktionen gesammelt und auf ihren DIP-Gehalt über Ionenchromatographie geprüft. Die gepoolte DIP-haltige Lösung wurde zur Entfernung von Carbonaten mit neutral gewaschenem Kationenaustauscher Dowex Marathon C (H<sup>+</sup>-Form) versetzt, bis die Gasentwicklung beendet war und die Lösung einen pH-Wert von etwa 3 aufwies. Der Ionenaustauscher wurde durch Dekantieren und Filtration entfernt und die Lösung im Rotationsverdampfer auf 5 l konzentriert. Anschließend wurde die Lösung mit 1M KOH neutralisiert. Die Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 5% Acticarbhone CXA Aktivkohle und 2 % Dicalite speed plus Filterhilfsmittel (bezogen auf Feststoffgehalt von DIP) behandelt, anschließend steriltfiltriert und gefriergetrocknet.

### 2.6.9 Colorimetrische Bestimmung von Phosphat

Phosphat wurde nach der von Baykov und Mitarbeitern [BAYKOV et al., 1989] beschriebenen Methode, welche auf der intensiven Grünfärbung der Phosphomolybdatkomplexe in Gegenwart von Malachitgrün basiert, bestimmt. Dazu wurden 1-10 µl Probe mit Wasser bis auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Nachweisreagenz (4 Teile 1,2 mg/ml Malachitgrün in 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 Teil 7.5% (w/v) Ammoniummolybdat und 0.08 Teile 11% (v/v) Tween 20) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 630 nm. 1 µM Phosphatlösung ergab bei diesem Verfahren eine Extinktion von 0.77.

## 2.7 Proteinanalytische Methoden

### 2.7.1 Ultrafiltration

Durch Ultrafiltration wurden Proteinlösungen entweder angereichert, umgepuffert oder aufkonzentriert. Die Ultrafiltration wurde in Vivaspin 6 und Vivaspin 15 mit Ausschlussvolumen von 5, 10, 30, 50 und 300 kDa (Vivasciences) bei 4°C (4000 x g) durchgeführt.

### 2.7.2 Proteinbestimmung [modifiziert nach BRADFORD, 1976]

Bei dem Bradford-Assay bindet ein saurer Farbstoff, Coomassie brilliant blue G-250, unspezifisch an kationische und nicht polare hydrophobe Seitenketten der Proteine. Im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration. Der Empfindlichkeitsbereich liegt zwischen 2 µg/ml – 10 µg/ml Protein. Protein wurde mit einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt. Es wurden 800 µl Probe und 200 µl BioRad Reagenz eingesetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 595 nm. Eine lineare Proportionalität der Messwerte war bis zu einer Proteinmenge von 10 µg/ml im Test gegeben. Als Standard diente Rinderserum-Albumin Fraktion V (VWR-International AG, Dietikon).

### 2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch nach Laemmli [LAEMMLI, 1970] in 7,5%-, 10%- und 12,5%igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0,1 cm) unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 0,1% SDS. Die SDS-Gele wurden mit 30%iger Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5%:1%) hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist der Tabelle 2.3 zu entnehmen. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese in 2fach oder 5fach konzentriertem Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentration: 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10% Glycin, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 0,005% Bromphenolblau) und 2-3 min bei 94°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Biometra) bei 10-18 mA durchgeführt. Der Laufpuffer (Anodenpuffer und Kathodenpuffer) bestand aus 5 mM Tris, 38,4 mM Glycin und 0,02% SDS (pH-Wert wie eingewogen). Für die Proteinwanderung im Sammelgel wurde für 10 min eine konstante Spannung von 70 Volt angelegt, die für die Proteinauftrennung im Trenngel auf 210 Volt (50 min) erhöht wurde. Als Standard diente der *Prestained Protein Ladder* #SM0671 von Fermentas mit Untereinheiten der Proteine von 10 bis 200 kDa. Die rekombinanten *E. coli* Proteine (0,1-0,2 mg/ml) sind in 62,5 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5 bei 25°C), 1 mM EDTA, 2 % SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub> und 33 % Glycerin. Weitere Marker wurden von Invitrogen verwendet: Mark12™ *unstained standard* mit den Proteinen Myosin (200 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phospho-

rylase B (97 kDa), BSA (66 kDa), Glutamindehydrogenase (55 kDa), Laktatdehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (31 kDa), Trypsininhibitor (21 kDa), Lysozym (14 kDa), Aprotinin (6 kDa), Insulin B-Kette (3,5 kDa) und Insulin A-Kette (2,5 kDa). SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen beinhaltet die Proteine Myosin (200 kDa), Phosphorylase (148 kDa), BSA (98 kDa), Glutamindehydrogenase (64 kDa), Alkoholdehydrogenase (50 kDa), Carboanhydrase (36 kDa), Myoglobin Rot (22 kDa), Lysozym (16 kDa), Aprotinin (6 kDa), Insulin B-Kette (4 kDa). Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie-*blue* oder Silbernitrat.

**Tabelle 2.3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele**

Lösungen	Trenngel (12%)	Sammelgel (3.75%)
30%ige Acrylamidlsg. mit 0.8% Bisacrylamid	2 ml	0.25 ml
1.5 M Tris/HCl Puffer pH 8.8 mit 0.4% SDS	1.25 ml	-
0.5 M Tris/HCl Puffer pH 6.8 mit 0.4% SDS	-	0.5 ml
A. bidest	1.75 ml	1.175 ml
APS, 10%ige Lsg.	17.5 µl	12.5 µl
TEMED	3.4 µl	2 µl

### 2.7.3.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung mit Coomassie (Brilliant) Blue R-250 ist eines der am häufigsten verwendeten Verfahren zur Visualisierung von Proteinen nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Coomassie-Färbung wurde ursprünglich als Wollfarbstoff entwickelt und erhielt ihren Namen in Gedenken an die britische Besetzung der Ashanti-Hauptstadt Kumasi oder "Coomassie" 1896.

Das Gel wurde zunächst bei 50°C im Wasserbad in der Färbelösung inkubiert, die 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 in Methanol/Essigsäure/Wasser-gemisch (3:1:6) enthielt. Zur Entfärbung der Protein-freien Bereiche wurde das Gel in 7,5% Essigsäure und 5% Methanol 15 min bei 50°C inkubiert. Die Coomassie-Färbung kann zwar zur Quantifizierung der Proteine verwendet werden, färbt aber Polypeptide mit vielen basischen Resten (Lysin, Arginin) verstärkt an. Die Nachweisgrenze liegt bei 200 ng pro 0.5 cm Bande.

### 2.7.3.2 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Ag<sup>+</sup>-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp-, und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag<sup>+</sup> der Komplexe zu Ag. Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit, 5 – 30 ng pro 0.5 cm Bande. Das Gel wurde zuerst 1 Stunde oder über Nacht fixiert (Methanol 50% (v/v), Essigsäure 12% (v/v) und Formaldehyd 0.1% (v/v)). Anschließend wurde dreimal für je 1 Minute mit 48% Ethanol und einmal mit Dinatriumthiosulfat 31.5% (w/v) gewaschen. Die Imprägnierung erfolgte 20 Minuten mit Silbernitrat 0.2%



(w/v) und Formaldehyd 0.075% (v/v). Vor dem nächsten Schritt wurde das Gel mit A. bidest gewaschen. Entwickelt wurde mit Dinatriumthiosulfat, Natriumcarbonat und Formaldehyd. Nach Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde die Reaktion mit EDTA-Lösung gestoppt [modifiziert nach BLUM et al., 1987].

#### 2.7.4 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Um das apparente Molekulargewicht der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel zu bestimmen, wurde eine Kalibrationskurve anhand eines Proteinstandards erstellt. Aufgrund dieser Kalibrationskurve kann über die Wanderungstrecke das apparente Molekulargewicht der Untereinheiten des zu bestimmenden Proteins geschlossen werden.

#### 2.7.5 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter nativen Bedingungen

Die apparente molekulare Masse der nativen rekombinanten Enzyme IPS, IMP und CITC und der nativen Di-*myo*-Inositol-1,1-phosphat-Synthase aus *P. woesei* erfolgte durch Molekularsieb-Chromatographie mittels der Gelfiltrationssäulen HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrad (Amersham Biosciences, Freiburg; Säulenvolumen 330 ml) bzw. Superose 6 (Amersham Biosciences, Freiburg; Säulenvolumen 25 ml). Die Gelfiltration wurde mit Hilfe der FPLC-Anlage BioLogic DuoFlow Pathfinder 20 system (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in einem Tris/KCl-Puffer (20-100 mM Tris/HCl, pH 8,8, 300 mM KCl) durchgeführt. Bei der Verwendung der präparativen Säule konnten bis zu 2 ml Proteinlösung aufgetragen werden. Die Flussrate betrug 2,2 ml/min und die Fraktionen wurden zu 1 ml gesammelt. Bei der Superose 6 betrug das maximale Auftragsvolumen 200 µl und die Flussrate 0,3 ml/min. Zur Kalibration der Läufe wurden folgende Proteine verwendet: Ferritin (MW 443.000; 1 mg), Alkohol-Dehydrogenase (MW 148.000; 1,25 mg), D-Lactat-Dehydrogenase (MW 78.000; 0,118 mg) und Cytochrom C (MW 12.500; 2 mg).

#### 2.7.6 Elektro-Proteintransfer „Western-Blot“

Der Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen auf ein festes Trägermaterial zur N-terminalen Sequenzierung erfolgte mittels Elektro-Blotting im Tank-Blot-Verfahren. Als Trägermaterial wurde eine hydrophobe Membran (ProBlott™, Applied Biosystems) verwendet. Die Blotmembran und das Watman-Papier wurden zwei Minuten in Transferpuffer (50 mM Borsäure-NaOH pH 9; 20 % MeOH; 0,1% SDS) äquilibriert. Nach der Gelelektrophorese wurde das Blot-Sandwich luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode ausgerichtet wurden. Der Transfer fand in einer Mini Trans-Blot® Kammer (BioRad, München) bei 4°C über Nacht mit einer konstanten Spannung von 10 V statt.

### 2.7.7 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz von elektrophoretisch aufgetrennten und auf einer hydrophoben Membran immobilisierten Peptiden erfolgte durch automatisierten Edman-Abbau in einem Gasphasen-Sequenzator. Diese Arbeit wurde von Herrn Dr. Arnd Petersen in der Arbeitsgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie am Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

### 2.7.8 Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente der gereinigten Proteine IMP und IPS wurden sowohl in *sitting drop*- als auch im *hanging drop*-Verfahren durchgeführt. Zur Eingrenzung der Kristallisationsbedingungen wurde ein grobes *sparse matrix-screening* [JANCARIK & KIM, 1991] unter Verwendung der Kits *Pre Crystallisation*, *Crystal Screen I* und *II* und *MPD Screen* (Hampton Research, Riverside, USA) durchgeführt. Die Verwendung des *Pre Crystallisation Kits* ermöglicht vorab die geeignete Proteinkonzentration einzustellen. Im *Screen I* werden die Parameter pH, Puffer, Salz und Fällungsmittel variiert. Der pH-Bereich erstreckt sich von pH 4,6 bis 8,5 in 50 verschiedenen Lösungen. Die verwendeten Fällungsmittel lassen sich in vier Kategorien einteilen: nicht flüchtige Substanzen (2-Methyl-2,4-pentandiol, PEG 400, PEG 4000 und PEG 8000), flüchtige Substanzen (2-Propanol), verschiedene Salze (z.B. Ammoniumsulfat) und Mischungen aus den zuvor genannten Klassen. *Screen II* verwendet in 48 Lösungen ein erweitertes Spektrum an Fällungsmitteln und Salzen. Der pH-Bereich erstreckt sich von 4,6 bis 9. Ausgehend von solchen Bedingungen, in denen sich Kristalle bildeten, wurden weitere Kristallisationsexperimente durchgeführt. Durch abgestufte Konzentrationsänderungen der jeweiligen Komponenten, Austausch eines Fällungsmittels und Variation des pH-Wertes erfolgte eine Optimierung des Kristallwachstums mit dem Ziel, größere Einkristalle mit höherer innerer Ordnung zu erhalten.

#### 2.7.8.1 Seeding

*Seeding*-Experimente wurden nach der *hanging-drop* Methode durchgeführt. Traten beim screening Kristalle auf, so konnten diese zum Wachstum größerer Kristalle verwendet werden. Dazu wurden unter gleichen Bedingungen ein neues Reservoir (800 µl) und ein Tropfen aus 2 µl Proteinlösung und 2 µl Reservirolösung auf einem silikonisiertem Deckgläschen vorbereitet. Mit einem feinen Katzenhaar wurde durch die gewachsenen Kristalle des *Screens* gestrichen und durch den neuen Tropfen gezogen. Die kleinen Kristalle regten zu neuem Kristallwachstum an.

#### 2.7.8.2 Polarisationsmikroskopie

Kristalle wurden unter einem Leitz Mikroskop mit Polarisationsfilter betrachtet, um Aussagen über optische Eigenschaften, Ordnungsgrad und Orientierung der Einheitszellachsen treffen zu können.

### 2.7.8.3 Röntgendiffraktion

Zur Aufnahme des Diffraktionsmusters wurde der Kristall auf dem Goniometerkopf befestigt. Als Röntgenquelle diente eine rotierende Kupferanode (GX-18, Elliot/Enraf-Nonius, Delft), die mit 50 mA und 35 kV betrieben wurde. Die Detektion erfolgte über einen elektronischen Multiwire Flächenzähler (Xentronics, Siemens/Nicolet, Madison, WI).

### 2.7.9 Heterologe Expression der *P. woesei* *myo*-Inositol-1-phosphat Phosphatase (IMP), *myo*-Inositol-1-phosphat Synthase (IPS) und der CTP-Inositol-1-phosphat Cytidyltransferase (CICT)

Die Expression der IMP, IPS und potentiellen CDP-Inositol bildenden Nucleotidyltransferasen von *P. woesei* erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Rosetta(DE3). Beide Stämme besitzen das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors. In den Expressionsvektoren stehen die klonierten Gene unter der Kontrolle der T7-Transkription [Studier et al., 1990]. Durch Zugabe von IPTG kann die Expression der klonierten Gene induziert werden. Einige Codons, wie z. B. die Arginincodons AGA und AGG, werden in *E. coli* selten benutzt und die entsprechenden t-RNAs liegen in sehr niedriger Konzentration vor. Dies kann bei rekombinanten Enzymen, die mehrere dieser Codons enthalten, dazu führen, dass sie nur schlecht oder gar nicht expremiert werden. Rosetta(DE3) besitzt ein zusätzliches Plasmid pRARE, welches für die seltenen tRNAs der Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA codiert. Diese Codons kommen vermehrt in *P. furiosus* vor.

### 2.7.10 Enzymtest der rekombinanten *myo*-Inositol-1-phosphat Synthase (IPS)

Die *myo*-Inositol-1-phosphat Synthase (EC 5.5.1.4) katalysiert die irreversible Reaktion von Glucose-6-phosphat [9] zu Inositol-1-phosphat [10] mit Hilfe von NAD<sup>+</sup>, welches eine Oxidoreduktion mit einer anschließenden Aldolkondensation des Rings ist. Das NAD<sup>+</sup> oxidiert die -CHOH- Gruppe zu -CO- am C-5 des Glucose 6-phosphat [9]. Dabei wird das C-6 Atom aktiviert und ist in der Lage mit der freien -CHO Gruppe am C-1 zu kondensieren; zuletzt reduziert das gebundene NADH die Carboxylgruppe am C5 wieder zu -CHOH- und geht als freies NAD<sup>+</sup> aus der Reaktion hervor. Der Nachweis der IPS-Aktivität erfolgte durch einen diskontinuierlichen Test bei 90°C im Thermocycler für 1 bis 5 min. Der Standardansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 5 mM NAD<sup>+</sup>, 10 mM Glucose-6-phosphat [9] und 0,16 U *myo*-Inositol-1-phosphat Synthase. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 45 µl 20%iger Trichloressigsäure gestoppt und der Ansatz für die ionenchromatographische Analyse aufgearbeitet.

### 2.7.11 Enzymtest der rekombinanten *myo*-Inositol-1-phosphat Phosphatase (IMP)

Die *myo*-Inositol-1-phosphat Phosphatase (IMP) (EC 3.1.3.25) besitzt zwei Aktivitäten: 1. Dephosphorylierung von Inositol-1-phosphat zu Inositol und Phosphat; 2. Hydrolyse von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat und Phosphat. Der Nachweis der IMPase-Aktivität erfolgte durch einen diskontinuierlichen Test bei 90°C im Thermocycler für 1 bis 5 min. Der Standardansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 3,5 mM *myo*-Inositol-1-phosphat und 10 µl Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 45 µl 20%iger Trichloressigsäure gestoppt und der Ansatz für die ionenchromatographische Analyse aufgearbeitet.

Der Nachweis der FBPase-Aktivität erfolgte im kontinuierlichen photometrischen Test bei 55°C in einem Eppendorf-Photometer mit temperierbarem Küvettenhalter. Der Standardansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1000 µl 100 mM Tris/HCl, pH 7, 2 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM Fructose-1,6-bisphosphat [28], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U Glucosephosphat Isomerase, 0,28 U Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und 0,16 U *myo*-Inositol-1-phosphat Phosphatase/FBPase.

### 2.7.12 Enzymtest für die putativen CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyltransferasen (CICT's)

Die CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyltransferase (EC 2.7.7.28) katalysiert die Reaktion von CTP mit *myo*-Inositol-1-phosphat [10] unter der Bildung von Cytidin-5'-diphosphat-*myo*-Inositol [12] und Pyrophosphat. Der Nachweis der CICT erfolgte durch einen diskontinuierlichen Test bei 80°C im Thermocycler für 1 bis 5 min. Der Standardansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl 100 mM Hepes, pH 7,6, 150 mM KCl, 1 mM *myo*-Inositol-1-phosphat [10], 1 mM CTP [26], 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 25 bis 50 µl CICT-Lösung sowie die Hilfsenzyme IMP und DIPS. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 45 µl 20%iger Trichloressigsäure gestoppt und der Ansatz für die ionenchromatographische Analyse aufgearbeitet.

### 2.7.13 Enzymtest für die putativen CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyltransferasen über Dünnschichtchromatographie (TLC)

Zur Bestimmung der Transferaseaktivität wurden die Reaktionsansätze (20 mM Tris/HCl pH 8,6; 10 mM IIP [10]; 5 mM CTP [26]; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT und Protein) mit den rekombinanten Transferasen nach Inkubation bei 90°C auf Kieselgelplatten (20 cm x 20 cm HPTLC Kieselgelplatten + F<sub>254</sub>; Merck, Darmstadt) aufgetragen. Nachdem die Proben getrocknet waren, erfolgte die Auftrennung der Substrate und Produkte auf den Platten unter gesättigter Gasphase in einer Lösungsmit-

telkammer. Das Laufmittel (100 ml) bestand aus einem Gemisch aus Ethylacetat, Essigsäure, Wasser und Ammoniak in einem Verhältnis von 6:6:2:1. Nach Beendigung des Laufes wurden die Platten unter einem Abzug getrocknet. Die Nukleotidverbindungen wurden unter UV-Licht betrachtet. Da sie das UV-Licht absorbieren, gelangt an dieser Stelle das Erregerlicht (254 nm) nicht an die Oberfläche der stationären Phase und es erscheinen dunkle Flecken auf dem fluoreszierenden ( $F_{254}$ , manganaktiviertes Zinksilikat) Hintergrund. Die Zuckerverbindungen wurden durch Besprühen mit Kaliumpermanganat sichtbar gemacht. Phosphatverbindungen konnten mit Hanes-Reagenz sichtbar gemacht werden. Die  $R_f$ -Werte der Substanzen sind definiert als Quotient aus der Wanderungsstrecke der Probe  $W_P$  und der Laufmittelfront  $W_L$ :

$$R_f = \frac{W_P}{W_L}$$

Hanes-Reagenz: 0,5 g Ammoniummolybdat wurden in 5,1 ml A. bidest gelöst und mit 1 ml 37%iger Salzsäure und 2,9 ml 60%iger Perchlorsäure versetzt. Der Ansatz wurde mit Aceton auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung musste einen Tag vor dem Gebrauch angesetzt werden. Sie färbt alle Phosphatverbindungen.

Kaliumpermanganat-Reagenz: 0,15 g Kaliumpermanganat in 15 ml Schwefelsäure (96 %) lösen. Eine unspezifische negativ Färbung.

Molybdatophosphorsäure-Reagenz: 20 %-ige Lösung von Molybdatophosphorsäure in Ethanol (96 %) zur Färbung von alkoholischen Verbindungen.

#### 2.7.14 Reinigung und Solubilisierung von „*inclusion bodies*“

Exprimierte Zellen Rosetta(DE3)+Trans1 wurden in PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*), dem als Detergenz zur Solubilisierung von lipophilen Membranbestandteilen 0,5 Vol% Triton X-100 zugesetzt war, resuspendiert. Zur Isolierung der *inclusion bodies* wurde die Bakteriensuspension in der French Press (4°C, 90 bar) aufgeschlossen und anschließend bei 4000 x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS/Triton X-100 aufgenommen und 3 x 15 sec. Im Ultraschall homogenisiert. Zur Entfernung des Detergenz wurde dieser Vorgang abschließend mit detergenzfreiem PBS wiederholt, eine Kontrolle der Reinheit erfolgte durch SDS-PAGE. Die so gewonnenen *inclusion bodies* wurden im 10fachen Volumen an Solubilisierungspuffer (6 M Guanidin/HCl, 100 mM DTT) aufgenommen und eine Stunde bei RT gerührt.

### 2.7.15 Renaturierung des Proteins aus *inclusion bodies* über Ni-NTA

Die Renaturierung von His-Tag Proteinen wurde über die Bindung an Ni-NTA durchgeführt. Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden mit äquiliertem (6 M Guanidin/HCl, 100 mM DTT) Ni-NTA-Material versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Material wurde in eine Lehrsäule gefüllt und zuerst mit 10 Säulenvolumen 3 M Guanidin/HCl, 50 mM DTT, 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 150 mM NaCl gewaschen. Zur Renaturierung des Proteins auf der Säule wurde diese anschließend mit 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol. Alle Renaturierungsschritte wurden über SDS-Page verfolgt.

### 2.7.16 Enzymtest für die Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat Synthase aus *P. woesei*

Die Di-*myo*-Inositol-1,1-phosphat Synthase (DIPS) katalysiert den letzten Schritt zur Bildung des Di-*myo*-Inositol-1,1-phosphat aus *myo*-Inositol-1-phosphat und Cytidin-5'-diphosphat-*myo*-Inositol, wobei CMP freigesetzt wird. Bei dem postulierten Syntheseschritt [WOLFF, Dissertation 2001] wird durch das Hilfsenzym *myo*-Inositol-1-phosphat Phosphatase ein oxyanionisches Inositol gebildet, das am Enzym gebunden bleibt. Durch einen nucleophilen Rückseitenangriff des gebundenen anionischen Inositols auf die  $\beta$ -Phosphatgruppe des Cytidin-5'-Diphosphat-*myo*-Inositol entsteht Di-*myo*-Inositol-1,1-phosphat. Der Nachweis der DIPS-Aktivität erfolgte durch einen diskontinuierlichen Test bei 90°C im Thermocycler für 1 bis 5 min. Der Standardansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 1 mM *myo*-Inositol-1-Phosphat, 0,25 mM Cytidin-5'-Diphosphat-*myo*-Inositol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und variable DIPS-haltige Lösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 45  $\mu$ l 20%iger Trichloressigsäure gestoppt und der Ansatz für die ionenchromatographische Analyse aufgearbeitet.

### 2.7.17 Anreicherung der DIPS aus *P. woesei*

Die DIPS wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen des anaeroben Mikroorganismus *P. woesei* angereichert.

#### 2.7.17.1 Herstellung von Zellextrakt

Die Ernte der *P. woesei*-Zellen erfolgte durch 20 minütige Zentrifugation bei 10,000 x *g* und 4°C in einem Beckmann-Rotor JLA 10. Das Pellet wurde in Extraktpuffer (100 mM Tris/HCL pH 8,8) aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert. Die Ernte aus dem 100 l Biostat-Fermenter erfolgte mit einer Durchlaufzentrifuge (CEPA, Carl Pachtenberg, Lahr/M oder Filtration über Amicon). Die erhaltenen Pellets wurden bei -80°C gelagert.

### 2.7.17.2 Zellaufschluss

Für enzymatische Bestimmungen wurden zellfreie Extrakte aus den gelagerten Zellen benötigt. Zellen aus dem Biostat-Fermenter wurden nach dem Auftauen (0.3-0.6 g Zellen/ml Puffer) in 100 mM Tris/HCL pH 8,8 resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch Hochdruckhomogenisation mit Hilfe einer French Press (20 K Zelle, Spectronic, New York, USA, 90 bar) unter aeroben Bedingungen. Der Aufschlussvorgang wurde mehrmals wiederholt, um eine möglichst hohe Ausbeute an zellfreiem Extrakt zu erhalten. Alle Schritte wurden auf Eiswasser bei 0°C durchgeführt, um einen Proteaseverdau zu minimieren [BEYNON & OLIVER, 1996]. Anschließend wurde das Homogenisat zentrifugiert (Ultrazentrifuge, 30 Minuten, 100.000 x g, 4°C). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand (im Folgenden als zellfreier Extrakt bezeichnet) anschließend mit Benzonase verdaut. Der zellfreie Extrakt wurde direkt in den Enzymtest oder zur Proteinreinigung eingesetzt.

### 2.7.17.3 Reinigung der DIPS

Die Anreicherung der DIPS sollte mittels Säulen-Chromatographien erfolgen. Um eine hohe Ausbeute bis zur apparenten Homogenität zu erreichen, wurden verschiedene chromatographische Materialien auf die Bindungs- und Elutionseigenschaften sowie auf Anreicherungsmöglichkeiten der DIPS getestet. Im Folgenden werden verschiedene Säulen aufgeführt, mit denen Vortests durchgeführt wurden.

#### Ionenaustauscher-Chromatographie-Säulen:

Starker Anionenaustauscher: Q-Sepharose Fast Flow  
(1 ml, HiTrap, Pharmacia)

Starker Kationenaustauscher: SP-Sepharose Fast Flow  
(1 ml, HiTrap, Pharmacia)

#### Hydrophobe Interaktions-Chromatographie-Säulen:

Die folgend aufgelisteten Materialien wurden von Amersham-Bioscience bezogen und in 100 ml- Säulen (Pharmacia) selbst gepackt: Octyl-HIC

#### Gelfiltrations-Chromatographie-Säulen:

HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrad (330 ml, Pharmacia)

In den Vorversuchen wurden Kenntnisse über die Bindungs- und Elutionseigenschaften der DIPS aus *P. woesei* gewonnen. Basierend darauf und unter Berücksichtigung der notwendigen Proteinbindekapazitäten wurden die geeigneten Säulen ausgewählt, die bis zu einer apparenten Homogenität der DIPS führen sollten. Alle Reinigungsschritte wurden unter aeroben Bedingungen bei 4°C oder RT durchgeführt. Während aller chromatographischer Schritte wurde die Elution von Proteinen durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Zur Erstellung von Elutionsprofilen wurde in ausgewählten Fraktionen die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford (siehe Seite 26) bestimmt. Während der Reinigung wurden

spezifische Aktivitäten im diskontinuierlichen Testverfahren bei 90°C mit 1 mM Inositol-1-Phosphat und 1 mM CDP-Inositol als Substrate in 20 mM Tris pH 8,8 (pH 7 bei 90°C) bestimmt (siehe Seite 33). Die eingesetzte Proteinmenge variierte je nach Reinheitsgrad der DIPS zwischen 195 µg und 0.1 µg.

### 2.7.18 Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose

Q-Sepharose ist ein stark basischer Anionenaustauscher und kann Proteine, die als Anionen vorliegen, binden. Die Elution erfolgt normalerweise durch Erhöhung der Cl<sup>-</sup>-Konzentration, wodurch die Protein-Anionen von ihren Bindungsstellen auf der Säule verdrängt werden, oder aber durch Absenken des pH-Wertes, wodurch die Protein-Anionen zunehmend protoniert werden und ihre negative Ladung verlieren. Der pH-Wert des Rohextraktes wurde mit 50 mM Tris/HCl auf pH 8,8 eingestellt. Der zellfreie Extrakt (190 ml) wurde mit 2 ml/min auf eine Q-Sepharose (150 ml) aufgetragen. Die DIPS-Aktivität fand sich vollständig im Durchlauf wieder. Der Durchlauf wurde gegen 1,5 M Ammoniumsulfat pH 6,5 dialysiert.

### 2.7.19 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Nach Zentrifugation der Ammoniumsulfatfällung wurde der Überstand auf eine 100 ml Octyl-HIC Säule aufgetragen, die zuvor mit 1,5 M Ammoniumsulfat pH 6,5 äquilibriert wurde. Die DIPS-Aktivität fand sich vollständig im Durchlauf wieder. Der Durchlauf wurde gegen 20 mM Tris pH 8,8 dialysiert und über Vivaspin 300 kDa eingeeengt.

### 2.7.20 Präparative Gelfiltration HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrad

Die eingeeengte Fraktion wurde zur weiteren Aufreinigung auf eine präparative Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrad aufgetragen. Die DIPS-Aktivität fand sich vollständig im Ausschlussvolumen wieder.

### 2.7.21 Bromcyanspaltung

Maximal 100 µg Protein wurden nach Dialyse gegen A. bidest in der Vakuumpumpe getrocknet und in 100 µl 70%iger Ameisensäure aufgenommen. Ein kleiner Kristall Bromcyan wurde dazugegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur und in Dunkelheit unter dem Abzug inkubiert [MATSUDAIRA, 1990]. Der Reaktionsansatz wurde danach in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Zum restlosen Entfernen der Säure wurden die Peptide mehrmals in A. bidest aufgenommen und wieder getrocknet. Anschließend wurden die Peptide in Probenpuffer aufgenommen, im SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und auf ProBlott™ (Applied Biosystems) gebロットet.



### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Kontinuierliche Fermentation von *P. furiosus* zur Produktion von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat

Ziel der kontinuierlichen Fermentation von *P. furiosus* war es, Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (DIP) [8] in größeren Mengen (Gramm-Maßstab) möglichst effizient zu gewinnen. Als Produzent bietet sich das hyperthermophile Archaeum *P. furiosus* an, das sich durch gute Wachstumseigenschaften (siehe Tabelle 3.1.) und durch eine hohe DIP-Syntheseleistung auszeichnet. So produziert *P. furiosus*, der bei 98°C in statischer Kultur gezogen wird, pro 1l Kulturvolumen 0,6 g Biomasse mit 0,3 % Trockengewichtsanteil an DIP. Um die Produktivität zu steigern, wurde ein kontinuierliches Fermentationsverfahren angestrebt, das unter wirtschaftlichen (bezüglich Energie- und Arbeitskosten sowie Zeitaufwand) als auch unter reaktionskinetischen Aspekten (Gewährleistung hoher gleichbleibender Produktionsraten durch konstante Reaktionsbedingungen) höhere Effizienz versprach.

**Tabelle 3.1.: Literaturdaten zu Fermentationsansätzen für *P. furiosus*.** Referenzen 1,2: FIALA & STETTER, 1989; 3: BROWN & KELLY, 1989; 4: BRYANT & ADAMS, 1989; 5: BLUMENTALS et al., 1990; 6: KOCH et al., 1992; 7: RAVEN et al., 1992.

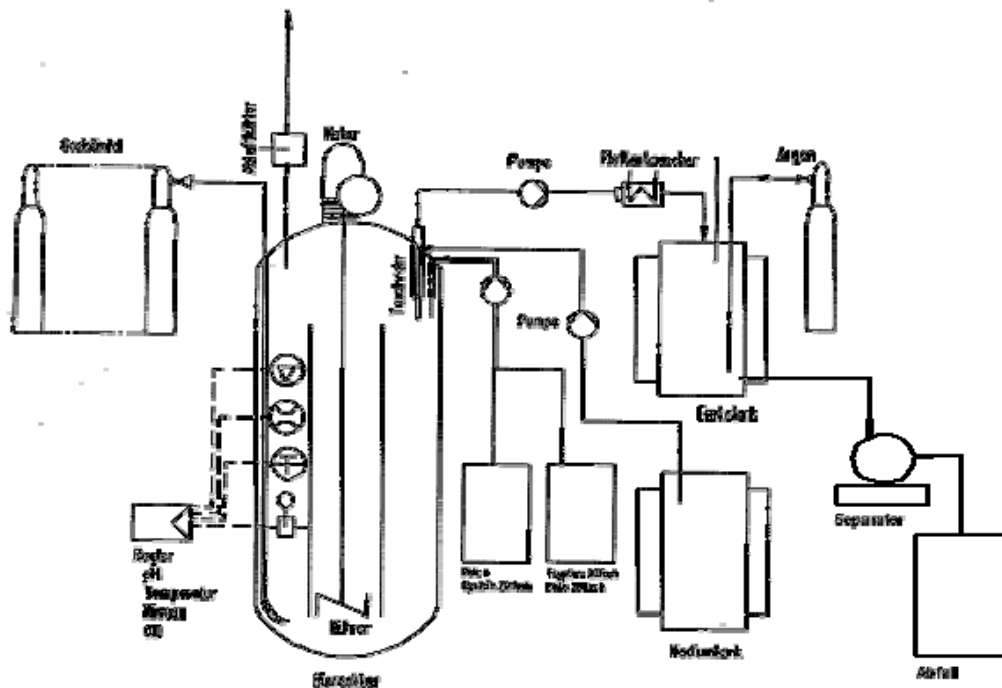
Referenz	C-Quelle	Schwefel (g/l)	Begasung	Temperatur (°C)	Fermenter	Kultur	Verdopplungszeit	Yield (g/l)	Zellzahl (Zellen/ml)
1	Stärke Maltose Pepton	10	N <sub>2</sub>	100	300 l Emalie	Batch	37 min	0,22	3 x 10 <sup>8</sup>
2	Hefe Trypton	30	-	98	125 ml Vials	Batch	1-2 h	-	3 x 10 <sup>8</sup>
3	Hefe Trypton	10	N <sub>2</sub>	98	750 ml	Kontinuierlich	D = 0,2 bis 0,7 h <sup>-1</sup>	-	1 x 10 <sup>8</sup>
4	Trypton Maltose	-	Ar	85-88	400 l	Batch	-	1-2,7	-
5	Hefe	10	N <sub>2</sub>	98	1,5 l	Kontinuierlich	D = 0,5 h <sup>-1</sup>	0,47	1 x 10 <sup>8</sup>
6	Hefe Pepton Stärke	10	H <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>	98	-	Batch	-	-	6,2 x 10 <sup>9</sup>
7	Hefe Pepton	-	N <sub>2</sub>	95	2 l Gas lift	Kontinuierlich	-	4	3 x 10 <sup>9</sup>

Für die Fermentation von *P. furiosus* wurde ein 42 l Laborpilotfermenter Typ LP351 der Firma Bioengineering AG, Wald, Schweiz, verwendet (Abb. 3.2.). Dieser mechanisch gerührte Reaktor bestand aus einem zylindrischen Behälter mit symmetrisch angeordneten Strombrechern. Durch ein in der Mitte des Reaktors eingebautes Verdrängungsrohr wurde dieser zu einem Air-Lift-Fermenter modifiziert (Abb 3.1, Planungsskizze Seite 38). Für die kontinuierliche Fermentation wurde eine Durchflussrate von 21 l/h bei einem Fermentationsvolumen von 30 l angestrebt. Diese Durchflussrate (D) entspricht der maximalen Wachstumsrate ( $\mu$ ), wie sie in stati-

### 3. ERGEBNISSE

scher Kultur bei 99°C zu beobachten ist. Damit sollte die Aufrechterhaltung des Fließgleichgewichts unter weitgehend optimalen Wachstumsbedingungen gewährleistet sein:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu \cdot x) - (D \cdot x) = 0; D = \text{Durchflussrate}; \mu = \text{Wachstumsrate}; x = \text{Zellmasse}$$



**Abb. 3.1.:Planungsskizze des Fließschemas zur kontinuierlichen *P. furiosus*-Fermentation modifiziert nach [RAVEN et al. 1993]:** Anaerobe Fermentation bei 99°C in einem 45 l Biostat-Reaktor. Frische Salzstocklösung, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle werden kontinuierlich mit einer Flussrate von 33 ml/min über Schlauchpumpen zugeführt. Die Füllhöhe wird durch das Tauchrohr mit nachgeschalteter Ablaufpumpe konstant gehalten. Die Begasungsrate mit Packgas (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 70:30) beträgt 0.84 <sup>3</sup>/h. Abgeerntete zellhaltige Fermentationlösung wird über einen Kryostaten (Huber Kältemaschinenbau GmbH) auf 4°C gekühlt, in einem anaeroben Erntetank (50 l) zwischengelagert und die Zellen kontinuierlich über einen Separator (Westfalia Separator AG) vom Medium getrennt. Die Leerung des Separators erfolgt alle 12 h. Das Zellmaterial wird bei -80°C zwischengelagert.

Im Idealfall könnten demnach in 24 h ca. 300 g Biomasse (Feuchtgewicht) produziert werden, im Gegensatz zu ca. nur 20 g Biomasse, die mit einer statischen Kultur im gleichen Fermenter pro Tag zu erzielen wären. Aus technischen Gründen konnte allerdings ein störungsfreier Betrieb nur bei einer Zulauftrate von 6 l/h gewährleistet werden. In Abb. 3.3. ist der Verlauf der Zellzahl bei der Fermentation vom 03.06.2002 bis 17.06.2002 dargestellt. Nach Einschalten des kontinuierlichen Be-

### 3. ERGEBNISSE

triebs sank die Wachstumsrate zuerst auf  $0,2 \text{ h}^{-1}$  ab und stieg dann über die Dauer der Fermentation auf  $0,6 \text{ h}^{-1}$ . Vorversuche zeigten, dass zu Beginn des kontinuierlichen Betriebes bei einer Zulauftrate von  $0,6 \text{ h}^{-1}$  die Zellen ausgewaschen wurden. Vermutlich konnte *P. furiosus* sich nicht schnell genug auf die Bedingungen des kontinuierlichen Betriebs einstellen. Dieses Phänomen wurde schon von Raven und Hammond [1992] beschrieben.

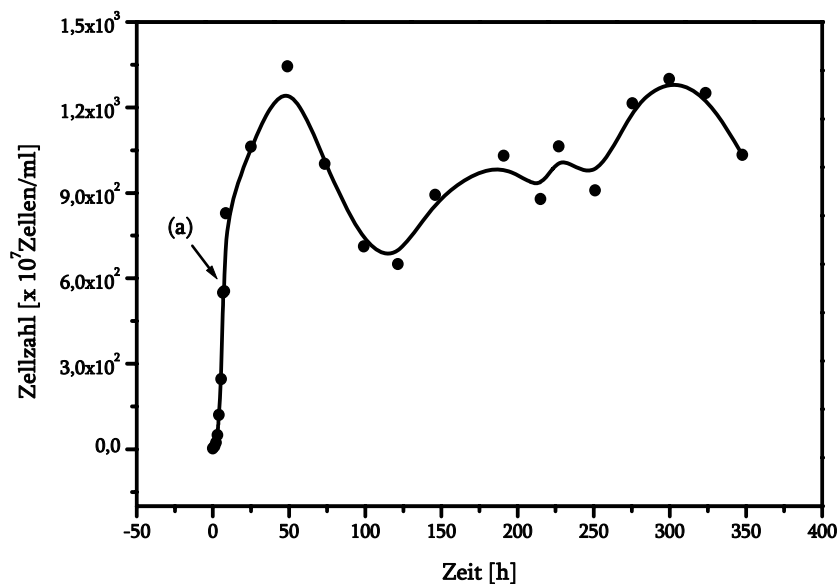


**Abb. 3.2.: Realisierung der kontinuierlichen *P. furiosus*-Fermentation im Technikumsmaßstab:** Technikum der Firma bitop AG in Witten-Annen.

Der kontinuierliche Betrieb konnte für max. drei Wochen aufrechterhalten werden. Zellzahl und Laugenverbrauch als Maß für die mikrobielle Säureproduktion wurden *online* gemessen und als Messgrößen für den Zustand der Fermentation herangezogen. Die Fermentation wurde nicht mit der optimalen Mediums-Zusammensetzung, wie sie von Raven und Hammond [1992] beschrieben wurde, durchgeführt. Aus Kostengründen wurde auf ein Minimalmedium bestehend aus Vitamin-, Spurenelement- und Aminosäurelösung verzichtet. Außerdem wurde als C-Quelle nicht reine Maltose oder lösliche Stärke zugesetzt, sondern Malzextrakt verwendet. Des weiteren wurde auf die Zugabe von Schwefel verzichtet, da einerseits Gefahr bestand, dass Schläuche und Abluftwege verstopften, und andererseits das Labor nicht mit den nötigen Abluftfiltern ausgestattet war, um den produzierten Schwefelwasserstoff abzuleiten.

### 3. ERGEBNISSE

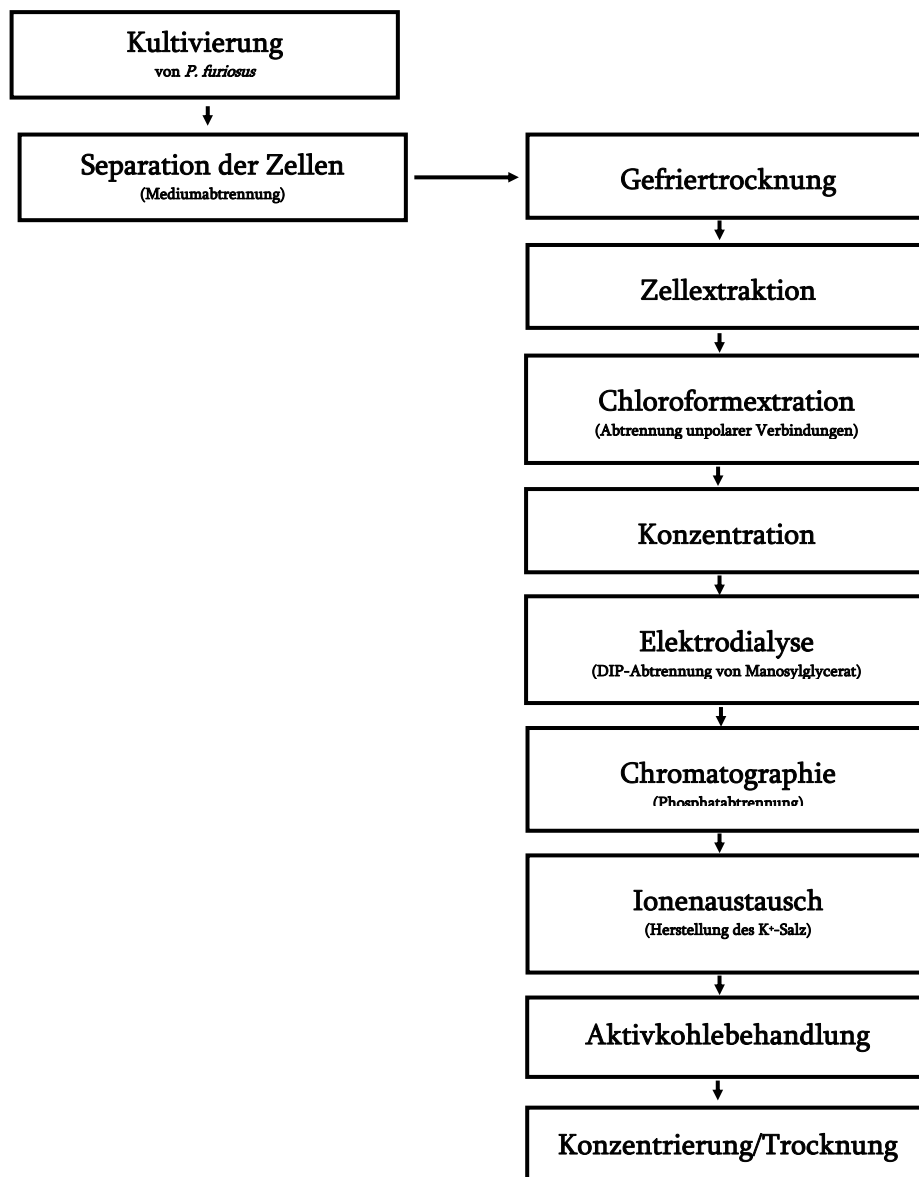
Die erste Variante der Fermentationsanlage mit einem Auffangbehälter für den Überlauf konnte nicht verwendet werden, da die Zellen nach drei Stunden auch unter anaeroben Verhältnissen lysierten. Die Zellen mussten kontinuierlich über einen Separator geerntet werden. Alle 12 Stunden konnten dem Separator ca. 250 g Feuchtzellen entnommen werden. Im Schnitt konnte pro Tag ca. 450 g bis 500 g Feuchtzellmasse geerntet werden. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.



**Abb. 3.3.: Wachstumsverlauf während der kontinuierlichen *P. furiosus*-Fermentation:** Start der Fermentation mit 1 % Inoculum. Nach 8 Stunden Batch-Fermentation bei  $95^{\circ}\text{C}$  wurde auf kontinuierlichen Betrieb (a) umgeschaltet ( $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ) und die Temperatur auf ca.  $99,5^{\circ}\text{C}$  erhöht. Der kontinuierliche Betrieb verlief im Schnitt zwei bis drei Wochen.

### 3.2 Aufreinigung von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat aus *P. furiosus*

Nach Lyophilisation der Zellmasse wurde diese mit Ethanol/Chloroform mehrmals extrahiert. Die wässrige Phase enthielt ein Gemisch aus annähernd gleichen Mengen von DIP [8] und Firoin (Mannosylglycerat) [4]. Der Anteil von DIP [8] an der Trockensubstanz betrug 2% DIP [8]. Nach Elektrodialyse, Anionenaustauschchromatographie und Aktivkohle-Behandlung wurde eine DIP-Lösung mit einer Reinheit von > 80 % erzielt (Abb. 3.4.). Insgesamt konnten aus 7 kg Trockenzellmasse von *P. furiosus* 100 g DIP [8] gewonnen werden. Diese Arbeiten wurden zu 90% von Mitarbeitern der Firma bitop durchgeführt.



**Abb. 3.4.: Fließschema für die Produktion und Aufreinigung von DIP:** *P. furiosus* Zellen aus der Fermentation wurden über einen Separator kontinuierlich von der Kulturflüssigkeit getrennt. Die Zellmasse wurde bei -80°C eingefroren und danach lyophilisiert. DIP [8] konnte über Ethanol/Chloroform extrahiert werden. Zur Trennung von Mannosylglycerat und Phosphat wurde die wässrige Phase über Elektrodialyse und Anionenaustauschchromatographie aufgearbeitet. Nach der Aktivkohlebehandlung wurde die DIP-Lösung konzentriert und getrocknet.

### 3.3 Herstellung der DIP-Synthese-Intermediate

Als mögliche Intermediate der DIP-Synthese kommen nach Untersuchungen von SCHOLZ et al. (1998); CHEN et al. (1998) und WOLFF, Dissertation (2001) Inositol-1-phosphat [10] und NDP-Inositol [12] in Betracht. Für die Analyse der enzymatischen Reaktionen der DIP-Biosynthese in *P. woesei* mussten diese Substanzen synthetisiert werden.

#### 3.3.1 Synthese von *myo*-Inositol-1-phosphat

Das Intermediat L-*myo*-Inositol-1-phosphat [10] wurde enzymatisch durch das rekombinante *P. woesei* Protein IPS synthetisiert. Das in der Dissertation von Wolff beschriebene Syntheseverfahren konnte dahingehend verbessert werden, dass aus 865 mg Glucosephosphat knapp 700 mg IIP gewonnen werden konnte und dies der zweifachen Menge entspricht. Das rekombinante Protein IPS [WOLFF, Dissertation 2001] wurde zuvor von *E. coli* Proteinen durch Hitzefällung bei 90°C für 30 min gereinigt und gegen 100 mM Hepes pH 7,6 dialysiert. Der Reaktionsansatz wurde statt in Tris-Puffer in Hepes-Puffer durchgeführt. 60 ml Proteinlösung aus 20 g *E. coli*-Zellmasse wurden mit 865 mg G6P und 400 mg NAD<sup>+</sup> für zwei Stunden bei 80°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch Ethanolextraktion und Säulenchromatographie bis zu einer Reinheit >90 % gereinigt. Die Ausbeute betrug 80 % von 865 mg Glucose-6-phosphat nach NMR-Daten (Abb. 3.5.).

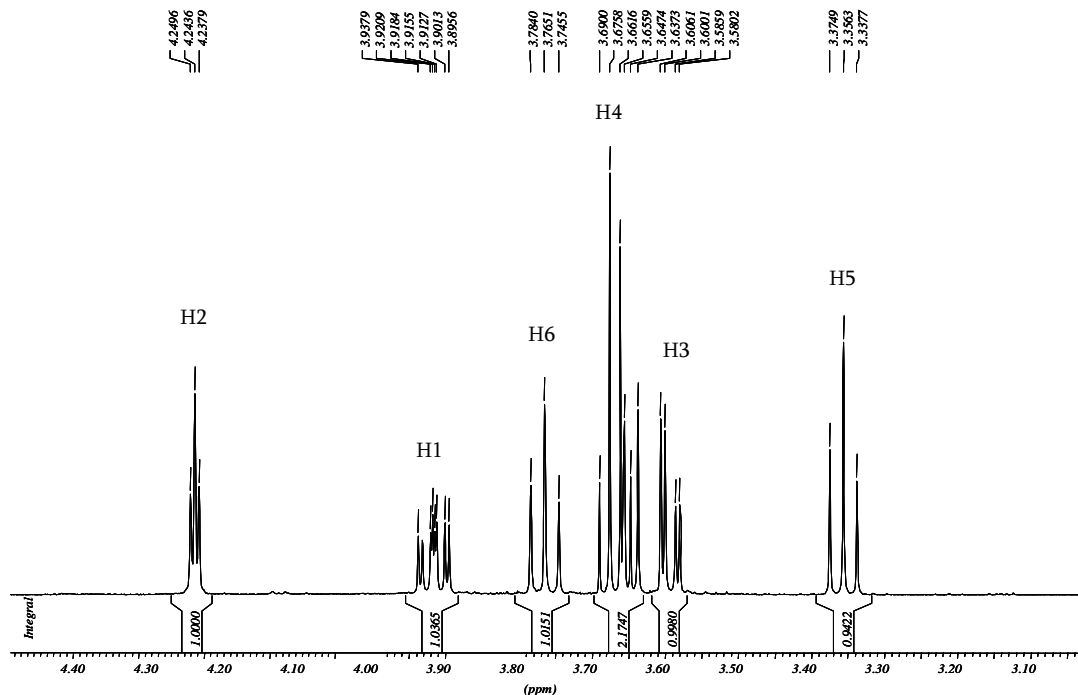


Abb 3.5.: <sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O (500 MHz) von *myo*-Inositol-1-phosphat gemessen am Spektrometer DRX-500: δ = 3,37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-4,H-5</sub> = 9,3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-5,H-6</sub> = 9,3 Hz; 1H, H-5); 3,6 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-2,H-3</sub> = 3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-3,H-4</sub> = 10,1 Hz; 1H, H-3); 3,68 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-3,H-4</sub> = 7,1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-5,H-6</sub> = 7,1 Hz; 1H, H-4); 3,77 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-4,H-6</sub> = 9,45 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-6,H-5</sub> = 9,8 Hz; 1H, H-6), (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-1,H-2</sub> = 11,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-6,H-1</sub> = 9,75 Hz; 1H, H-1); 4,2 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-1,H-2</sub> = 2,8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-2,H-3</sub> = 3 Hz; 1H, H-2).

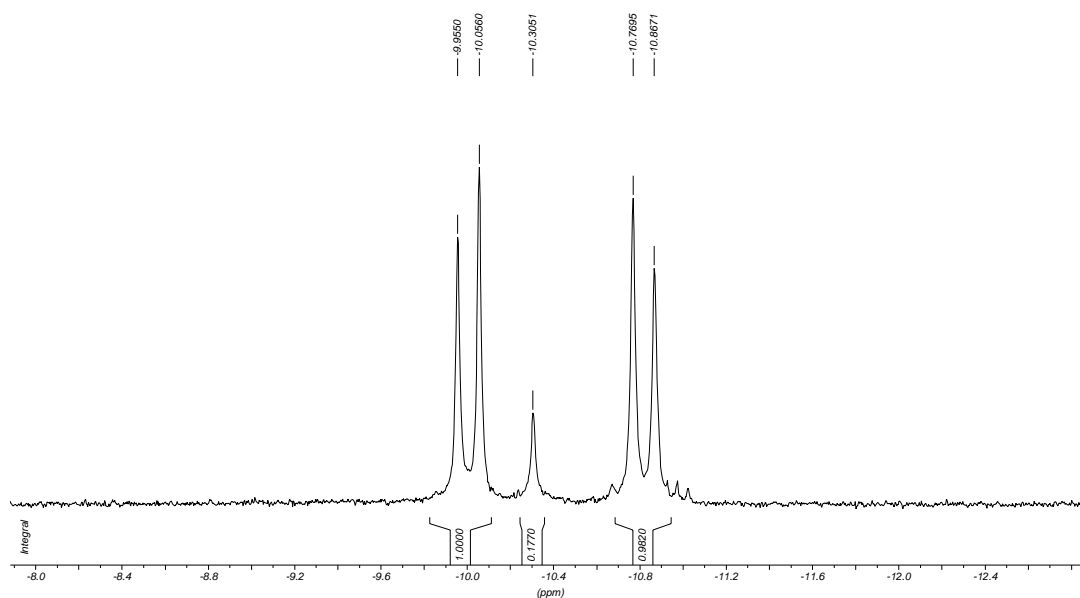
### 3. ERGEBNISSE

Das  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des *myo*-Inositol-1-phosphats wurde durch Tripletts der Protonen H-2, H-1, H-6, H-4 und H-5 charakterisiert. Die zu erwartenden Dubletts von Dubletts konnten nicht registriert werden, da die Protonen axial und äquatorial zueinander positioniert sind. Entscheidend für die Größe der vicinalen Kopplung (Protonen, die über zwei Atome miteinander verknüpft sind) ist die Anordnung der Protonen zueinander. Für die vicinalen Kopplungen von axialen zu äquatorialen Protonen ( $^3J_{\text{H-a,He}}$ ) wurden Kopplungskonstanten zwischen 2 und 5 Hz bzw. für die axialen zu axialen Protonen zwischen 7 und 12 Hz erwartet [HEESE et al., 1991]. Wie zu erwarten zeigten die Protonen H-4, H-5 und H-6 die typischen Tripletts der axialen-axialen Kopplung mit Kopplungskonstanten zwischen  $^3J = 7,1$  und  $^3J = 9,8$  Hz. H-2 koppelte dagegen axial-äquatorial mit H-1 und H-3 mit einer erwarteten Kopplungskonstanten von  $^3J = 2,8$  Hz. Dagegen zeigten H-1 und H-3 Kombinationen aus axial-axial und axial-äquatorialer Kopplung. Für das H-3 Proton ergab sich daher ein Dublett von Dubletts mit  $^3J = 3$  Hz und  $^3J = 10,1$  Hz. Das H-1 spaltete sich nochmals in ein Dublett von Dubletts von Dubletts auf, dass auf die Kopplung zum Phosphor zurückzuführen ist. Die Kopplungskonstante beträgt  $^3J = 9,75$ .

Dass *myo*-Inositol-1-phosphat aus Glucose-6-phosphat synthetisiert wurde, konnte neben dem  $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -NMR Spektren auch durch Messungen an der Ionenchromatographie und durch Dephosphorylierung mit der rekombinaten Inositolmonophosphatase aus *P. woesei* bei  $90^\circ\text{C}$  bestätigt werden. Ein Teil des *myo*-Inositol-1-phosphats [10] wurde zur chemischen Synthese des Cytidin-5'-diphosphat-*myo*-inositols [12] verwendet.

### 3.3.2 Synthese von Cytidin-5'-diphosphat-*myo*-Inositol

Zur Herstellung des unsymmetrischen Pyrophosphates CDP-I [12] wird in Anlehnung eines Verfahrens von Roseman [ROSEMAN et al., 1961] Cytidin-5'-phosphormorpholidat [13] mit I1P [10] umgesetzt, wie schon von Wolff [WOLFF, Dissertation 2001] beschrieben. Der Morpholinrest fungiert dabei als Abgangsgruppe während des nucleophilen Angriffs des Phosphatrestes von L-*myo*-Inositol-1-phosphat [10]. Für eine bessere Löslichkeit von I1P [10] wurde es von der H<sup>+</sup>-Form in das tri-*n*-Octylammoniumsalz überführt. Die Umsetzung erfolgte in abs. Pyridin unter trockenem Argon für eine Woche bei Raumtemperatur. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in Natriumacetat-haltigem Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit Diethylether extrahiert und die organische Phase verworfen. Das Produkt, gelöst in der wässrigen Phase, wurde nach enzymatischer Dephosphorylierung des restlichen I1Ps über zwei säulenchromatographische Schritte (DEAE-Sephadex; Sephadex G10) aufgearbeitet. Entsprechend der <sup>31</sup>P-NMR-Analyse erhielt man aus 120 mg I1P ein 60 % reines Produkt (Abb. 3.6.).



**Abb 3.6.:** <sup>31</sup>P-NMR in D<sub>2</sub>O (121,5 MHz) von CDP-Inositol gemessen am Spektrometer DRX-500 <sup>1</sup>H-entkoppelt:  $\delta = -10,1$  (d,  $^2J_{P-\alpha, P-\beta} = 12,3$  Hz; 1P);  $-10,9$  (dd,  $^3J_{H-1, P-\beta} = 11,8$  Hz; 1P)

Das <sup>31</sup>P-NMR Spektrum von CDP-Inositol [12] wurde von zwei Dubletts bei  $\delta = -10,1$  für P <sub>$\alpha$</sub>  und bei  $\delta = -10,9$  für P <sub>$\beta$</sub>  mit je 12 Hz geprägt. Im <sup>1</sup>H-gekoppelten Spektrum spaltete sich der Phosphorsäureester P <sub>$\beta$</sub> , der am Inositol-Rest gebunden ist, noch mal in ein Dublett von Dubletts auf (Daten nicht gezeigt). Dies wurde durch die Kopplung von P <sub>$\beta$</sub>  mit dem H-1 Proton des Inositol-Restes hervorgerufen. Eine Aufspaltung in ein Dublett von Triplets für das P <sub>$\alpha$</sub>  durch Kopplung mit den Methylen-Protonen des Cytidin-Restes trat nicht auf.



### 3.4 Anreicherung und Identifizierung der Di-*myo*-Inositol-1-phosphat Synthase (DIPS) aus *P. woesei*

Der Nachweis einer Enzymaktivität, die die Synthese von DIP [8] ausgehend von CDP-Inositol [12] und IIP [10] in Rohextrakten von *P. woesei* katalysiert, wurde bereits von Stefan Wolff [WOLFF Dissertation, 2001] erbracht. Eine Reinigung des Enzyms war allerdings aufgrund der schlechten Bindungseigenschaften des Enzyms an herkömmliche Chromatographiematerialien bis dahin nicht geglückt. Die Reinigung der DIPS wurde angestrebt, um aus der Protein-Sequenz des Enzyms eine Nucleotidsonde für das codierende Gen abzuleiten, über das die Überexpression des Enzyms erfolgen sollte.

#### 3.4.1 Anreicherung der DIPS aus *P. woesei* Rohextrakt

Für die Reinigung der DIPS aus *P. woesei* wurden in der Regel 30 bis 40 g Zellen (Nassgewicht) eingesetzt. Nach Aufschluss der Zellen konnte im Rohextrakt von *P. woesei* DIPS mit einer spezifischen Aktivität von 0,5 mU/mg nachgewiesen werden (Tab.2). Nach DNA-Verdau durch Benzonase und Hitzefällung 30 min bei 95°C stieg die spezifische Aktivität auf 1,74 mU/mg. Für die Reinigung der DIPS wurden zunächst verschiedene Chromatographie-Matrices auf ihre Eignung geprüft, das Enzym zu binden. Folgende Trennmedien wurden auf ihre DIPS Bindungseigenschaften untersucht: Kationenaustauschmaterial SP-Sepharose bei verschiedenen pH-Werten von 4 bis 8; verschiedene Affinitätsmaterialien (Farbstoff-gekoppelte Trennmaterialien): green 5, yellow 3, green 19, blue 72, red 120, brown 10, Ciberon blue, yellow 86 und blue 4 (Sigma-Aldrich); hydrophobe Interaktionschromatographie: Phenyl-Sepharose, Phenyl-Sephadex, Octyl- und Butyl-Sepharose. Es gelang jedoch nicht, die DIPS an ionisches (kationisches oder anionisches) oder hydrophobes Trägermaterial zu binden und eine Anreicherung über entsprechende Elutionsverfahren zu erzielen. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine Interaktion der DIPS mit der Inositolmonophosphatase (IMP), wie sie aus Arbeiten von Herrn S. Wolff gefordert wurde, zur Anreicherung der DIPS ausgenutzt werden kann. Geprüft werden sollte, ob die geforderte Wechselwirkung zwischen DIPS und IMP für eine spezifische Separierung der DIPS ausgenutzt werden kann. Um dies zu überprüfen wurde die rekombinante IMP von *P. woesei*, die über Q-Sepharose und Gelfiltration gereinigt wurde, kovalent an NHS-Harz gebunden und das Produkt als Affinitäts-Chromatographie-Matrix eingesetzt. Allerdings konnte weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Inositol-1-phosphat eine Bindung im Durchflussverfahren nachgewiesen werden. Entsprechend diesen Erfahrungen wurde eine Reinigungsstrategie verfolgt, die zum Ziel hatte, die Fremdproteine über mehr oder weniger spezifische Wechselwirkungen mit verschiedenen Chromatographie-Matrices von der DIPS abzutrennen. Nach Verwendung von Q-Sepharose ff (150 ml Q-Sepharose; 20 mM Tris pH 8,8) konnte im Durchlauf eine DIPS-Aktivität von 11,83 mU/mg festgestellt werden. Über die spezifische Aktivität der im weiteren Verlauf der Reinigung anfal-

### 3. ERGEBNISSE

lenden Enzymfraktionen konnte maximal eine 100fache Anreicherung (mit der höchsten spezifischen Aktivität nach Gelfiltration) ermittelt werden (siehe Tabelle 3.2.).

**Tabelle 3.2.: Reinigungsverlauf der nativen DIPS aus 40 g *P. woesei*-Feuchtzellen:** Benzona-se/HP: DNA-Verdau des RE mit Benzonase und anschließende Hitzepräzipitation; RE = Rohextrakt.

Reinigungs-schritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamt-aktivität (mU)	Spz. Aktivität (mU/mg)	Reinigungs-faktor
RE	3336	1668	0,5	-
Benzonase/HP	1729	3010,2	1,74	3,48
Q-Sepharose	280,8	3321,5	11,83	23,66
Ammoniumsulfatfällung				
Octyl-HIC	30,53	599,04	19,63	39,3
Superdex 200 Prepgrade	0,32	429,6	53,7	107,4

Wie das Elektropherogramm nach Gelfiltration zeigt (Abb. 3.8 und 3.9), konnte die DIPS nicht vollständig gereinigt werden. Ein Vergleich der SDS-PAGEs verschiedener Aufreinigungsschritte mit den Aktivitäten der verschiedenen Enzymfraktionen grenzte jedoch die Auswahl der Protein-Banden, die als Kandidaten für die DIPS in Frage kommen, ein.

Des Weiteren zeigte sich nach Gelfiltration nur noch Aktivität im Ausschlussvolumen der Säule wie in Abb. 3.7. gezeigt. Die Beobachtung, dass DIPS-Aktivität im Ausschlussvolumen auftrat, wurde als weiterer Hinweis darauf gewertet, dass es sich bei der DIPS tatsächlich um ein Protein mit einer Molekülmasse größer als 450 kDa handelte. Die Fraktionen des Gelfiltrationslaufs wurden auf die spezifische Aktivität hin untersucht (Abb. 3.8). Es zeigte sich, dass die höchste spezifische Aktivität in Fraktion 54 mit 180 mU/mg auftrat. In den darauf folgenden Fraktionen nahm die spezifische Aktivität mit zunehmendem Proteingehalt ab. In Fraktion 54 war nur die Bande bei einer Molekülmasse von 150 kDa nach Silberfärbung auszumachen. Daher war zu vermuten, dass es sich bei dieser Bande zwischen 150 und 200 kDa (Abb.3.8. und 3.9.) um die DIPS handelte, da diese deutlich mit der Aktivität angereichert wurde.

### 3. ERGEBNISSE

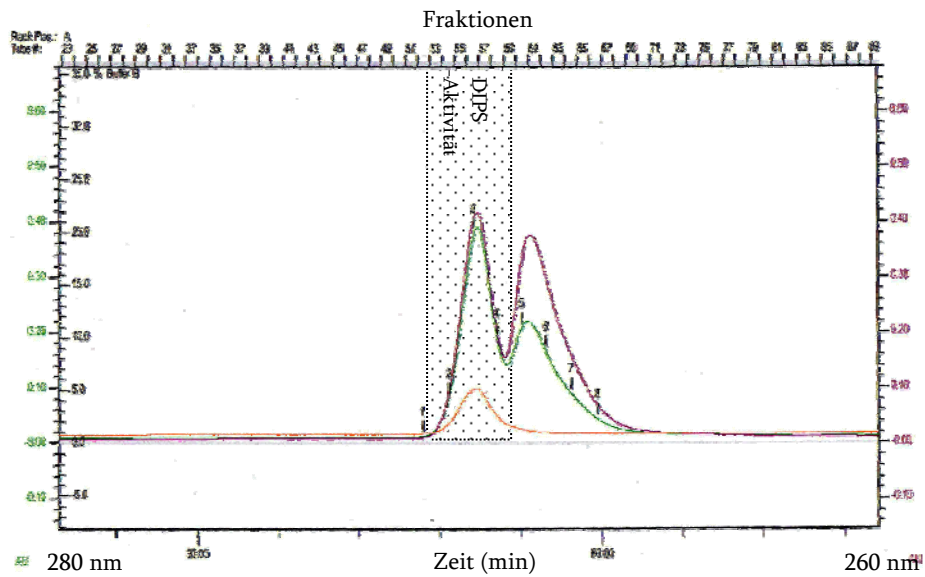


Abb. 3.7.: Reinigung der DIPS aus *P. woesei* durch Ausschlusschromatographie über HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Amersham Biosciences; Säulenvolumen 330 ml): Chromatogramm des letzten Reinigungsschritts der DIPS. Dargestellt ist die UV-Adsorption bei 260 (lila), 280 (grün) und 405 nm (orange). Eine DIPS-Aktivität konnte nur in den Fraktionen 54 bis 60 nachgewiesen werden (gepunktete Fläche).

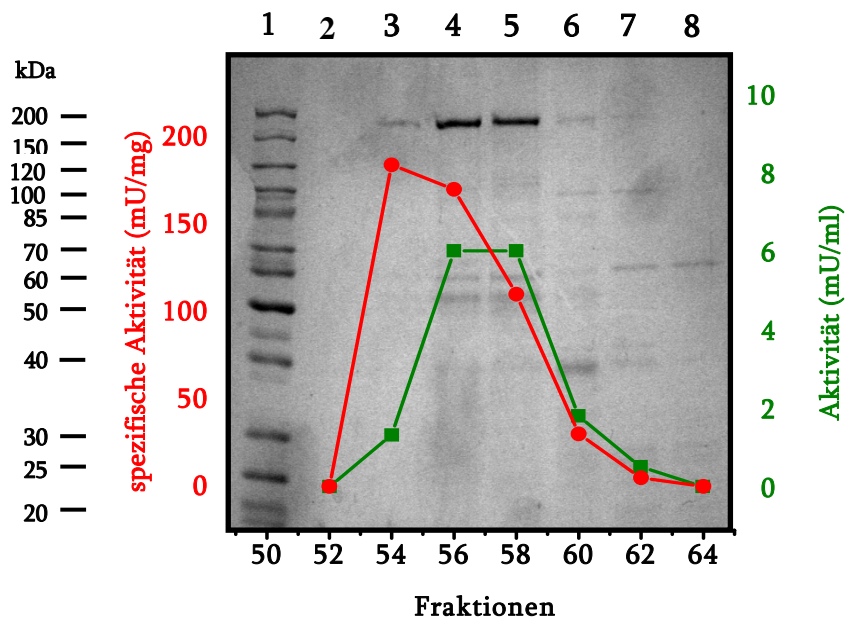
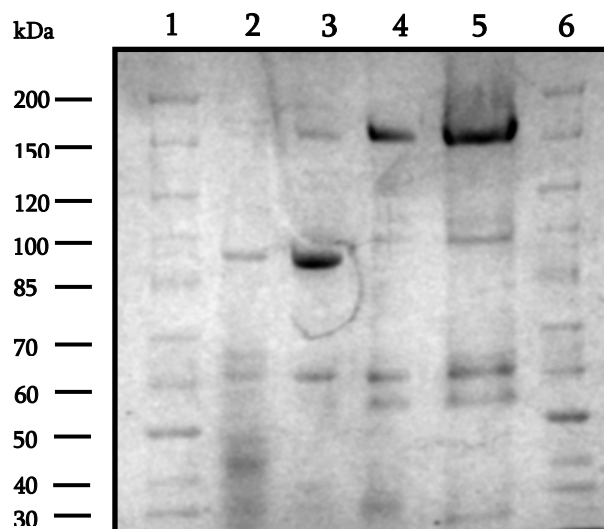


Abb. 3.8.: Reinigung der DIPS aus *P. woesei* durch Ausschlusschromatographie über HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Amersham Biosciences; Säulenvolumen 330 ml): in Rot dargestellt die spezifische Aktivität der Fraktion; in Grün dargestellt die Gesamaktivität der Fraktion; SDS-PAGE 10%; 1: Proteinstandard 10 bis 200 kDa; 2: Fraktion 52 keine DIPS-Aktivität; 3: Fraktion 54 180 mU/mg; 4: Fraktion 56 170 mU/mg; 5: Fraktion 58 110 mU/mg; 6: Fraktion 60 30 mU/mg; 7: Fraktion 62 5 mU/mg; 8: Fraktion 64 keine DIPS-Aktivität; Silberfärbung.

### 3. ERGEBNISSE



**Abb. 3.9.: Anreicherung der DIPS aus *P. woesei* über verschiedene Chromatographieverfahren:** SDS-PAGE 10%; 1 und 6: Proteindstandard 10 bis 200 kDa; 2: Rohextrakt nach Benzonaseverdau; 3: Q-Sepharose-Durchlauf, 4: Octyl-Sepharose-Durchlauf, 5: HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Gel-filtration). Aufgetragen wurden auf jede Spur 5 µg Protein.

Das Elektropherogramm (Abb. 3.9.) veranschaulicht noch einmal den Reinigungs-verlauf der DIPS. Der Verlauf der Bandenstärke des 150 kDa Proteins entspricht weitestgehend der Zunahme der spezifischen DIPS-Aktivität und bestätigt die Ver-mutung, dass es sich bei diesem Protein um die DIPS handeln könnte.

### 3.4.2 Bestimmung der molekularen Masse der angereicherten DIPS

Eine exakte Bestimmung der molekularen Masse der nativen DIPS war mittels Molekularsieb-Chromatographie nicht möglich. Bei der Verwendung der präparativen Gelfiltrationssäule (Superdex 200 Prepgrade) eluierte das Enzym im Ausschlussvolumen und hatte damit unter nativen Bedingungen eine Molekülmasse von größer 450 kDa (Abb. 3.10).

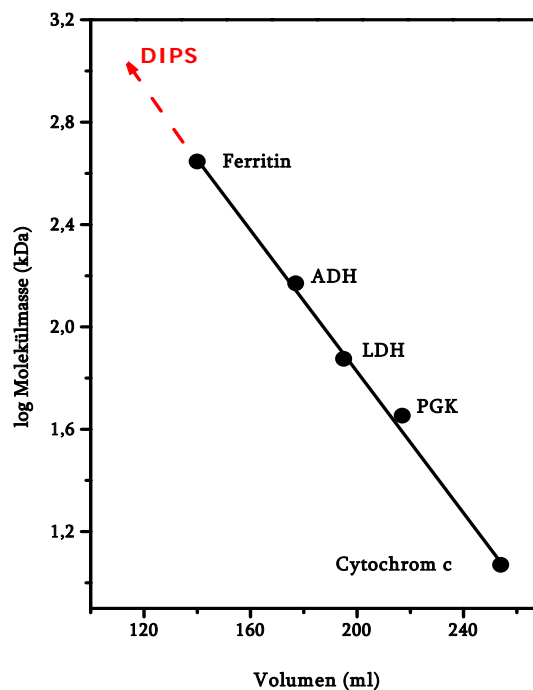
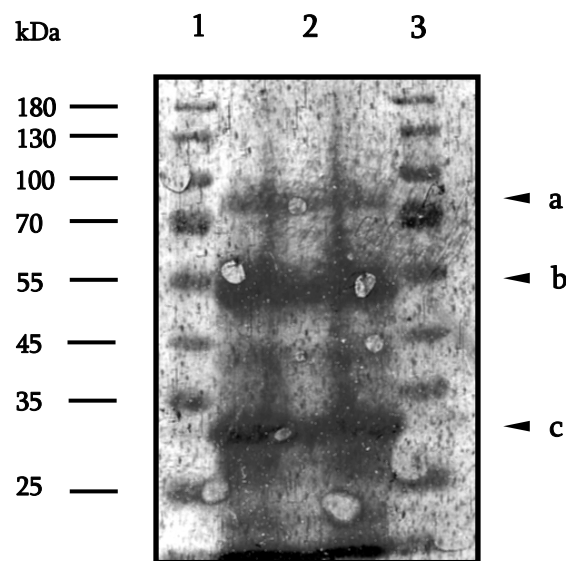


Abb. 3.10.: Bestimmung der molekularen Masse der DIPS aus *P. woesei* durch Ausschlusschromatographie über HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Amersham Biosciences; Säulenvolumen 330 ml): Molekülmassen der Referenzproteine: Ferritin (aus Pferdemuskel): 443 kDa; ADH (Alkohol-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*): 148 kDa; LDH (Laktat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*) 78 kDa; Phosphoglyceratkinase 45 kDa; Cytochrom c (aus Rinderherz) 12,5 kDa. Die molekulare Masse der DIPS liegt außerhalb des zu kallibrierenden Bereichs der Gelfiltrationssäule.

### 3.4.3 Bromcyanspaltung und Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Fragmente

Für die Identifizierung des putativen DIPS-codierenden Gens wurde eine N-terminale Ansequenzierung des angereicherten Proteins angestrebt. Allerdings war es nicht möglich, das Protein auf eine PVDF-Membran zu blotten und damit die Sequenzierung durchzuführen. Eine Übertragung auf die Membran gelang auch nicht durch Erhöhung des pH-Wertes des Blotpuffers oder der Zugabe von SDS. Um dennoch Sequenzinformationen für die Klonierungsarbeiten zu erhalten, wurde 1 ml (80 µg) der angereicherten DIPS mit Bromcyan gespalten. Die Peptide wurden über SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und geblottet (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11.: PVDF Blott der Bromcyanspaltung von der DIPS:** PVDF nach SDS-PAGE 7,5%; 1 und 3: Proteindstandard 15 bis 180 kDa; 2: Peptide nach Bromcyanspaltung. Die mit den Pfeilen markierten Banden a, b und c wurden N-terminal ansequenziert.

Nach Blotten auf eine PVDF-Membran konnten die N-terminalen Aminosäuresequenzen der Peptide a, b und c jeweils über 15 Positionen bestimmt werden:

	1	5	10	15
a	M D V V S	A A D I	A A A I	G S L
b	M P G W I	A E F K	V D S G	K I I
c	M P G W I	A E F K	V D S G	K I I

Es ist zu erkennen, dass die Fragmente b und c aus demselben Sequenzbereich stammen. Peptid b scheint demnach das Produkt einer unvollständigen Spaltung darzustellen. Dies bestätigt, dass die ersten Banden auf dem Blot zu einem Protein gehörten.

### 3.4.4 Identifizierung eines Gens von *P. furiosus*, das für ein homologes Protein der vermuteten DIPS von *P. woesei* kodiert

Aus den N-terminalen Sequenzen konnte in der vom Genom Center des Departments of Human Genetics der Universität Utah veröffentlichten Gesamtsequenz von *P. furiosus*, einer sehr eng mit *P. woesei* verwandten *Pyrococcus*-Art [UTAH GENOM CENTER WEBSITE, 1999] eine annotierte Sequenz identifiziert werden (BLAST-P-Suche: ALTSCHUL et al., 1997), welche die Aminosäure-Sequenz der Peptide aufwies (Abb. Anhang 1.). Damit ist das *P. furiosus*-Genprodukt dem *P. woesei*-Protein homolog. Die *P. furiosus* Sequenz ist als putative ATPase (Vanadat-sensitiv) unter der *accession number* NP\_579128 annotiert worden. Das kodierende Gen PF1399 liegt an Position 1312763 – 1314580. Das Gen mit 1818 Nukleotiden kodiert für ein Protein von 605 Aminosäuren (AS). Die kodierende Sequenz startet mit dem Codon ATG und endet mit TAG. Unmittelbar stromaufwärts des Initiationscodons befindet sich eine Sequenz, die identisch zu den putativen Ribosomenbindestellen für andere *Pyrococcus*-Gene ist (GAGGT), wie z. B. für das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase von *P. woesei* [ZWICKEL et al., 1990] und das der  $\alpha$ -Amylase von *P. furiosus* [JORGENSEN et al., 1997]. Ebenso konnten Sequenzen identifiziert werden, die als TATA Box bei –30 (TTTATACC) als auch das Transkription Factor B Recognition Element (BRE) an Position –37 (GAAAAG) als wichtige Promotorelemente fungieren könnten [THOMM, 1996]. Stromabwärts des Stoppcodons befindet sich eine Pyrimidin-reiche Region, die womöglich eine Transkriptionsterminationsstelle [THOMM, 1996] darstellt.

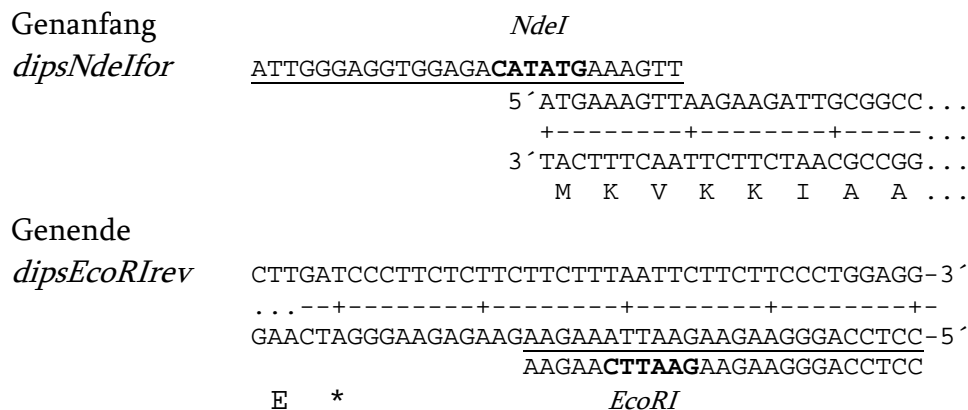
>gi|18977771|ref|NP\_579128.1| putative ATPase, vanadate-sensitive [*P. furiosus* DSMZ 3638]

MKVKKIAALAVGAAGATLGFASAQGEVPEIPKDFVVDGKPNVKIVVGSEGAAMDVVSAA  
DIAAAIGSLLYTEKDVEVTDATVVARVDVTEPIEKIPVFDNYDTNTAHKYKVGDNLDKDVPAW  
WNGSDFVANFSTSVWNDGVYDKAVEIRIDNIGSVGSYDLAANLTLKGIALDGITDSEVDVIDDF  
EDFTVNVSTVVANISLVVNYTLKGQPTVDKITKDETIPEVNLITNLFNDNSTLAKFYDPDYDGYT  
IEGVKVLKSGVGEETLKILDNEYPIVFIGKDIQETACGDCFTYGKDWGEDYYNQGETYNFGDY  
KVTILDIDVARDKAFIKVESPSGDTETTTLAVGGTEAQTFDGGIRIQKDTFVGISGTNAVKLHV  
WTDLTKTVKSGDEIMPGWIAEFKVDSGKIIWFALNKNTLSDKRVPLFNTYAVDVKATIRK  
DDVEYGLTAYIYIEPLETQYETVEAAIGESIDDEYVVDVKAESPEVAYIPQKLTA  
ITVLDTEVLEQGLENVGSNLILVGGPVVNVTAALAEALGVPLTYEEWAEKFGTGKEGW  
TIVYKEQCGKIGYGVVVLVAGSDREGTRAAAEALLDYIANLE

Abb. 3.12.: Aminosäuresequenz des annotierten Leserahmens gi|18977771| aus *P. furiosus*: Grau unterlegt sind die Methioninreste, die als BrCN-Spaltstellen für die Generierung der drei sequenzierten Peptide fungierten. Unterstrichen sind die Aminosäuren, die durch den Edman-Abbau bestimmt wurden.

### 3.4.5 Klonierung des homologen Gens PF1399 aus *P. woesei* in den Expressionsvektor pET24a

Zunächst wurde der identifizierte Leserahmen gi|18977771| PF1399 für die DIPS aus *P. furiosus* mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und genomischer DNA aus *P.woesei* amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konstruiert, dass sie am 5'-Ende noch jeweils eine Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in den Expressionsvektor pET24a (Abb. Anhang 10) besaßen (Abb. 3.13).



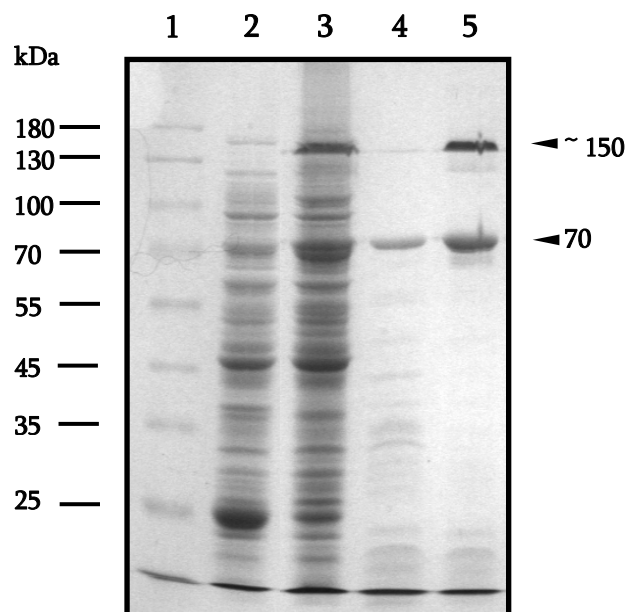
**Abb. 3.13.: Konstruktion der Expressionsprimer.** Aufgeführt sind die Randbereiche der DIPS von *P. furiosus* mit den Sequenzen der Primer *dipsNdeIfor* und *dipsEcoRIrev*, die für die Amplifikation des Gens zur Klonierung in den Expressionsvektor pET24a verwendet wurden. Die Restriktionsschnittstellen sind in den Primersequenzen fett gedruckt.

Die *NdeI*-Schnittstelle am Anfang des Gens *dips*, die das Startcodon ATG mit einbezieht, gewährleistete die spätere Klonierung des Gens im richtigen Leseraster. Die *EcoRI* Schnittstelle des Revers-Primers konnte einfach durch Austausch eines Adenins zu Cytidin generiert werden. Es lagen keine internen Schnittstellen für *NdeI* und *EcoRI* im Gen vor. Das mittels PCR amplifizierte Gen wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit der Ligase ligiert; *E. coli* DH5α wurde mit diesem Gen transformiert. Der Einbau des Gens in den Vektor wurde durch „boiling PCR“ überprüft. Nach Plasmidpräparation wurde das Plasmid auf Mutationsfreiheit durch Sequenzierung überprüft.



### 3.4.6 Expression des rekombinanten Proteins von *P. woesei* in *E. coli*

Um die putative DIPS von *P. woesei* zu exprimieren, wurde der Expressionsstamm *E. coli* Rosetta(DE3) mit dem Plasmid-Konstrukt dipspET24a transformiert. Die Zellen enthalten die T7-RNA-Polymerase, deren Expression durch IPTG die Expression des klonierten Gens induziert. Die DIPS von *P. woesei* ließ sich in *E. coli* unter aeroben Bedingungen bei 37°C exprimieren. Nach Aufschluss von 1 g Expressionszellen konnte ein Protein mit der Molekülmasse von 150 kDa durch Hitzefällung bei 95°C für 30 min angereichert werden (Abb 3.14.) (2,5 mg/ml). Der dialysierte Extrakt des Proteins zeigte bislang im DIPS-Enzymtest keine Aktivität.



**Abb. 3.14.: Heterologe Expression der putativen *P. woesei* DIPS in *E. coli* Rosetta und Reinigung:** SDS-PAGE 7,5 %ig; Coomassie gefärbt; 1: Proteindstandard 15 bis 180 kDa; 2: Rohextrakt *E. coli* Rosetta ohne Insert; 3: Expression im Rohextrakt von *E. coli* Rosetta mit Insert dipspET24a; 4: hitzegefällter Proteinextrakt *E. coli* Rosetta ohne Insert; 5: hitzegefällter Proteinextrakt *E. coli* Rosetta mit Insert dipspET24a.

### 3.5 Klonierung und Expression der putativen Nucleosidtriphosphat-Hexose-phosphat-Nucleotidyltransferasen von *P. woesei* zur Synthese von CDP-Inositol

Parallel zu den Versuchen, eine CTP-Inositol-1-phosphat-Cytidylyl-Transferase aus *P. woesei* zu isolieren, wurde die Genomsequenz von *P. furiosus* nach Nucleosid-Triphosphat-Nucleotidyltransferasen durchsucht, um homologe Gene, die für entsprechende Transferasen in dem nahe verwandten *P. furiosus* codieren, identifizieren zu können. Mit dieser Kenntnis sollte es möglich sein, die entsprechenden Proteine von *P. woesei* gezielt zu exprimieren.

Insgesamt wurden im *P. furiosus* Genom sieben verschiedene als Nucleosidtriphosphat-Hexosephosphat-Nucleotidyltransferase-Gene annotierte Leserahmen gefunden (Abb. Anhang 2 bis 7). Im Folgenden werden die einzelnen Leserahmen, sowie deren Klonierung in *E. coli* Rosetta und die Expression der Gene, beschrieben. Nach Expression der rekombinanten Enzyme wurde deren Fähigkeit der CDP-Inositol-Synthese aus CTP [26] und IIP [10] getestet.

#### 3.5.1 Klonierung der putativen Nucleosidtriphosphat-Hexosephosphat-Nucleotidyltransferasen

Die Leserahmen sind in der *P. furiosus* Datenbank annotiert. Die Homologen dieser Gene von *P. woesei* wurde über PCR mit den Primern *trans1-8 for*, *trans1-8 rev* und genomischer *P. woesei* DNA als Template amplifiziert (Bedingungen: 2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 47 bis 55°C/ 2,5 min 72°C; 10 min 72°C) und in den Expressionsvektor pET11c (Abb. Anhang 8) und pET15b (Abb. Anhang 9) inseriert. Für die Inserierung in die Expressionsvektoren mittels PCR-Mutagenese wurde für alle Gene am Startcodon eine *NdeI*-Schnittstelle und stromabwärts direkt hinter dem Stopcodon eine *BamHI*-Schnittstelle (außer für Trans 3 eine *BglII*-Schnittstelle) eingeführt. Die zur Amplifikation verwendeten Primer besaßen folgende Sequenzen, die in Tabelle 3.3 dargestellt sind.

**Tabelle 3.3.:PCR-Amplifikation von putativen Nucleosid-Triphosphat-Nucleotidyltransferase-Genen aus *P.woesei*.**  
 Die Primer wurden auf der Basis von homologen Genen im *P. furiosus*-Genom konzipiert.

Leserahmen hypothetischer Gene in <i>P. furiosus</i> und Genprodukte	Mutagene Primer für die Amplifikation homogener Gene in <i>P. woesei</i>	Bedingungen für die PCR (Denaturierung, Annealing, Elongation)	Bemerkungen
gi 18976607  PF0235  Glucose-1-phosphat Thymidyltransferase  EC 2.7.7.24	<div>                         Genanfang  <i>Trans1for</i> </div> <div>                         Genende  <i>Trans1rev</i> </div> <div> <pre>                                 NdeI AATGGGGAGTT<b>CATATG</b>AAAGCTA       5' ATGAAAGCTATAATACTTGCC...       +-----+-----+-----+       3' TACTTTCGATATTATGAACGG...       M K A I I L A ...  TCTTTTCCACTAACTCTTTACTAATAAGTTAAAATT-3' -----+-----+-----+----- AGAAAAAGGTGATTGAGAAATGATTATTCCAATTTTAA-5'       TGAGAAATGAT<b>GATCC</b>AATTTTAA       E K * BamHI                     </pre> </div>	2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 47°C/ 2,5 min 72°C; 10 min 72°C	<i>Inclusion bodies</i> bei der Expression (37°C)
gi 18976813  PF0441  Galactose-1-phosphat Uridyltransferase  EC 2.7.7.12 oder EC 2.7.7.10	<div>                         Genanfang  <i>Trans2for</i> </div> <div>                         Genende  <i>Trans2rev</i> </div> <div> <pre>                                 NdeI TTGGTGGAC<b>CATATG</b>AGGGAGCTG       5' ATGAGGGAGCTGAGATATAAC...       +-----+-----+-----+       3' TACTCCCTCGACTCTATATTG...       M R E L R Y N ...  CCCTTTACATAAATTCGAGAGGACGCAGAG-3' -----+-----+-----+----- GGGAAATGTATTTAAGCTCTCCTACGCTCTC-5'       ATGTATTTAAG<b>GGATC</b>CTACGCTCTC       G K C I * BamHI                     </pre> </div>	2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 50°C/ 2,5 min 72°C; 10 min 72°C	<i>Inclusion bodies</i> bei der Expression (37°C)
gi 18976820  PF0448  putative Mannose-1-phosphat Guanylyl-transferase  EC 2.7.7.13	<div>                         Genanfang  <i>Trans3for</i> </div> <div>                         Genende  <i>Trans3rev</i> </div> <div> <pre>                                 NdeI ATGGGGGATAAA<b>CATATG</b>AAGG       5' ATGAAGGTTCTAATAATGGCC...       +-----+-----+-----+       3' TACTTCCAAGATTATTACCGG...       M K V L I M A ...  CTCTATGACAATCCTATTTCGCCATCCCGCAATCCAAATT-3' -----+-----+-----+----- GAGATACTGTTAGGATAAGCGGTAGGCGTTAGGTTTAA-5'       GATAAGCGGT<b>AGATCT</b>TTAGGTTTAA       E I L L G * BglII                     </pre> </div>	2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 55°C/ 2,5 min 72°C; 10 min 72°C	Nach Expression konnte keine Proteinbande als rekombinantes Enzym identifiziert werden

**Tabelle 3.3.:PCR-Amplifikation von putativen Nucleosid-Triphosphat-Nucleotidyltransferase-Genen aus *P.woesei*.**  
 Die Primer wurden auf der Basis von homologen Genen im *P. furiosus*-Genom konzipiert.

Leserahmen hypothetischer Gene in <i>P. furiosus</i> und Genprodukte	Mutagene Primer für die Amplifikation homogener Gene aus <i>P. woesei</i>	Bedingungen für die PCR (Denaturierung, Annealing, Elongation)	Bemerkungen
gi 18976834  PF0462 CDP-Diacylglycerol-Glycerol-3-phosphat-3-Phosphatidyltransferase EC 2.7.8.5	<div>           Genanfang  <i>Trans4for</i>            GGAGGTTGAAAC<b>CATATG</b>CTGAGC            5' GTGCTGAGCAATTTGAGACC...            +-----+-----+-----+            3' CACGACTCGTTAAACTCTGG...                V L S N L R P...         </div> <div>           Genende  <i>Trans4rev</i>            CCGAACTTTTATCCCTACTACTCTAAACGATGGA-3'            +-----+-----+-----+            GGCTTGAAAAATAGGGATGATGAGATTTGCTACCT-5'                      TAGGGATCCTGAGATTTGCTACCT                      L E K * <i>Bam</i>HI         </div>	2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 55°C/ 2,5 min 72°C; 10 min 72°C	<i>Inclusion bodies</i> bei der Expression (37°C)
gi 18977142  PF0770 Glucose-1-phosphat Uridyltransferase EC 2.7.7.9	<div>           Genanfang  <i>Trans5for</i>            ATGAGGGGGTGTG<b>CATATG</b>AAGG            5' GTGAAGGTTAGGAAGGCCGT...            +-----+-----+-----+            3' CACTTCCAATCCTTCGGCA...                V K V R K A ...         </div> <div>           Genende  <i>Trans5rev</i>            GTTCTACTCATCCTGGATGTCATAGGCAATATTATGG-3'            ---+-----+-----+-----+            CAAGATGAGTAGGACCTACAGTATCCGTTATAATACC-5'                      GACCTACAGGATCCGTTATAATACC                      Q D E * <i>Bam</i>HI         </div>	Nicht erstellt	Das Homolog dieses Gens von <i>P. woesei</i> konnte über PCR mit den Primern trans5 for, trans5 rev und genomischer <i>P. woesei</i> DNA als Template unter verschiedenen Bedingungen nicht amplifiziert werden. Dieses Konstrukt wurde daher nicht weiter bearbeitet.
gi 18977292  Nucleotidyltransferase	Nicht bearbeitet	Nicht bearbeitet	Nach Analyse der <i>Alignments</i> konnte keine Homologie zu einer Nucleotidyltransferase gezeigt werden. Aufgrund des <i>Alignments</i> zeigt sich nur eine Ähnlichkeit zu einer metallabhängigen Phosphohydrolase aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 und hypothetischen Proteinen aus anderen Organismen

**Tabelle 3.3.:PCR-Amplifikation von putativen Nucleosid-Triphosphat-Nucleotidyltransferase-Genen aus *P.woesei*.**  
 Die Primer wurden auf der Basis von homologen Genen im *P. furiosus*-Genom konzipiert.

Leserahmen hypothetischer Gene in <i>P. furiosus</i> und Genprodukte	Mutagene Primer für die Amplifikation homogener Gene in <i>P. woesei</i>	Bedingungen für die PCR (Denaturierung, Annealing, Elongation)	Bemerkungen
gi 18977488 PF1116  Glycerol-3-phosphat Cytidyltransferase  EC 2.7.7.39	<div> <div>Genanfang</div> <div> <div>Trans7for</div> <div> <div> <div>NdeI</div> <div>ACGCGAGGGATAACATATGGG</div> <div>5' ATGGGAGATAACGCAAGGTA...</div> <div>3' TCGCTCCCTATTCTATACCC...</div> <div>M G D N R K V...</div> </div> </div> </div> <div> <div>Genende</div> <div> <div>Trans7rev</div> <div> <div>3'</div> <div>AATAATCGGAACGTTTGTGAATGAAGTCGAAACTTCAATT-</div> <div>TTATTAGCCTTGCAAAACACTTACTTCAGGTTTGAAAGTTAA-</div> <div>5'</div> <div>CACTTACTCCTAGGTTGAAAGTTAA</div> <div>G T G G S T * BamHI</div> </div> </div> </div> </div>	2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 55°C/ 2,5 min 72°C; 10 min 72°C	Lösliches Protein
gi 18977728  PF1356  Glucose-1-phosphat Uridyltransferase  EC 2.7.7.9	<div> <div>Genanfang</div> <div> <div>Trans8for</div> <div> <div>NdeI</div> <div>GGGTGTGCTGGTGCATATGAGAA</div> <div>5' GTGAAAGTGAGAAAAGCG...</div> <div>3' CACTTTCACTCTTTTCGC...</div> <div>V K V R K A...</div> </div> </div> <div> <div>Genende</div> <div> <div>Trans8rev</div> <div> <div>3'</div> <div>CCCCTTTCTTATACTACCTGGGCTATTTTCAGTCTA-</div> <div>GGGGAAGAATATGATGGACCCGATAAAGTCAGAT-</div> <div>ATGATGGACCCGATAAAGTCAGAT</div> <div>G E R I * BamHI</div> </div> </div> </div> </div>	2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 50°C/ 2,5 min 72°C; 10 min 72°C	<i>Inclusion bodies</i> bei der Expression (37°C)

### 3.5.2 Charakterisierung der putativen Nucleosidtriphosphat-Hexosephosphat-Nucleotidyltransferasen Trans7 und Trans1

Um die Proteine heterolog in *E. coli* zu exprimieren, wurde das jeweilige Plasmidkonstrukt pET11c + Trans2 bis 7 und pET15b + Trans1 und 8 in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta(DE3) transferiert. Die Klone wurden in 1 l LB-Medium angezogen und mit IPTG bei einer  $OD_{578} = 0,6$  induziert. Die Proteine der Klone 1,2,3,4 und 8 lagen vermutlich durch Fehlfaltung bei der Expression in *Inclusion bodies* vor. Nur Trans7 zeigt bei Expression ein lösliches Protein im Überstand.

#### 3.5.2.1 Molekulare Eigenschaften der putativen CTP-Inositol-1-phosphat Cytidyl-Transferase Trans7

Das Molekulargewicht der Trans7 wurde unter nativen und denaturierenden Bedingungen bestimmt. Für die Untereinheit wurde in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 15 kDa ermittelt, welches nicht ganz mit dem aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Wert von 16,9 kDa übereinstimmte. Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts über Gelfiltration ergab einen Wert von 17 kDa. Somit handelte es sich bei der Trans7 um ein monomeres Enzym. Dieses ist auch nur in dieser Form aktiv und lag so wie zuvor beschrieben nur unter reduzierten Bedingungen vor. Unter nicht reduzierenden Bedingungen bildete die Trans7 ein Dimer aus (Abb. 3.19).

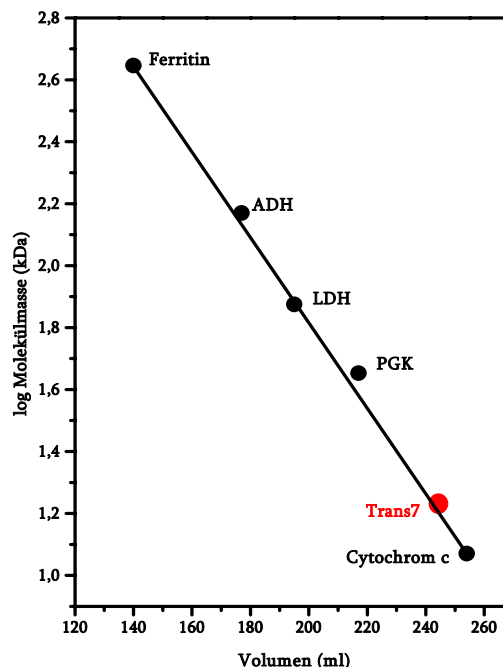
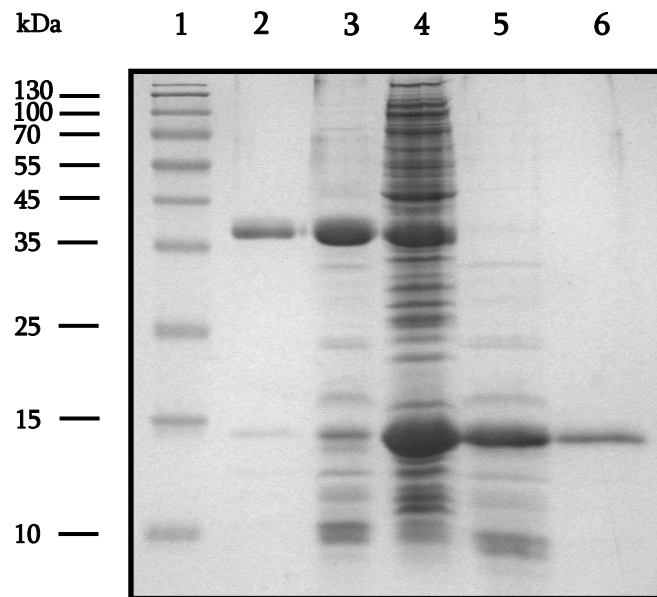


Abb. 3.19.: Bestimmung der molekularen Masse der rekombinanten Trans7 durch Ausschlusschromatographie über HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Amersham Biosciences; Säulenvolumen 330 ml); Molekulargewichte der Referenzproteine: Ferritin (aus Pferdemuskel): 443 kDa; ADH (Alkohol-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*): 148 kDa; LDH (Laktat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*) 78 kDa; Phosphoglyceratkinase 45 kDa; Cytochrom c (aus Rinderherz) 12,5 kDa. Die molekulare Masse der Trans7 beträgt nach Gelfiltration 17 kDa. Trans7 ist somit ein Monomer.

### 3. ERGEBNISSE

Der zellfreie Extrakt zeigte nach Hitzefällung (90°C, 30 min) in Abhängigkeit von der Zugabe von Mercaptoethanol (5 mM) zwei Banden (app. Molekülmasse: 15 bzw. 35 kDa) im SDS-PAGE (Abb. 3.15.). Offensichtlich ist das Protein oxidationsempfindlich und bildete Disulfid-Bindungen in Abwesenheit eines Reduktionsmittels aus (zusätzliche Bildung einer 35 kDa-Isoform).



**Abb. 3.15.: Heterologe Expression der *P. woesei*Trans7 in *E. coli* Rosetta(DE3): SDS-PAGE**

Elektropherogramm (15%); 1: Prestained Proteinstandard ~ 10 bis 180 kDa; 2: Gelfiltration von *E. coli* Rosetta(DE3) mit pET11c + Trans7 Hitzfällung in Gegenwart von 5 mM Mercaptoethanol; 3: hitzegefällter Proteinextrakt *E. coli* Rosetta(DE3) mit pET11c + Trans 7 Hitzfällung in Gegenwart von 5 mM Mercaptoethanol; 4: Expression in *E. coli* Rosetta(DE3) mit pET11c + Trans 7 Hitzfällung in Gegenwart von 5 mM Mercaptoethanol; 5: hitzegefällter Proteinextrakt *E. coli* Rosetta(DE3) mit pET11c + Trans 7 bei 90°C, 30 min in Gegenwart von 15 mM DTT; 6: Gelfiltration von *E. coli* Rosetta(DE3) mit pET11c + Trans 7 Hitzfällung in Gegenwart von 15 mM DTT

### 3.5.2.1.1 Katalytische Eigenschaft des Genprodukts des *P. woesei*-Homologs von PF1116 (PW1116) Trans7

Die Bestimmung der Enzymaktivität des rekombinanten Proteins erfolgte in einem diskontinuierlichen Test bei 90°C mit Hilfe der IMP und der angereicherten DIPS-Enzymfraktion, die keine CTIC-Aktivität aufwies. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM I1P, 2,5 mM CTP, 1,5 mU DIPS und 10 mU IMP. Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeiten 0 bis 30 min mit 45 µl 20%iger eiskalter Trichloressigsäure gestoppt. Nach 30 min konnte eine DIP-Produktion nachgewiesen werden, die auf eine CDP-I Bildung schließen lässt (Abb. 3.16.)

**Tabelle 3.4.: Nachweis der spezifischen CTP-I1P-Cytidylyl-Transferase Aktivität des Genprodukts von PW1116:**

Testkomponenten	DIP-Synthese in Gegenwart von hitze- gefälltem Extrakt	
	aus nicht trans- formierten <i>E. coli</i>	Klon 7
MgCl <sub>2</sub> , I1P, CTP	–	–
MgCl <sub>2</sub> , I1P, CTP, IMP	–	–
MgCl <sub>2</sub> , I1P, CTP, DIPS	–	–
MgCl <sub>2</sub> , I1P, CTP, IMP, DIPS	–	+
MgCl <sub>2</sub> , I1P, CDP-I, IMP	–	–

Wie aus der Tabelle 3.4. ersichtlich wird DIP nur im kompletten Ansatz gebildet. Der Rohextrakt aus nicht transformierten *E. coli*-Zellen zeigt diese Aktivität nicht. Zusätzlich zu der Analyse der Enzymaktivität über Ionenchromatographie wurden Tests mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dieses Verfahren wurde bevorzugt, da nicht genügend angereicherte DIPS für den gekoppelten enzymatischen Test zur Verfügung stand.



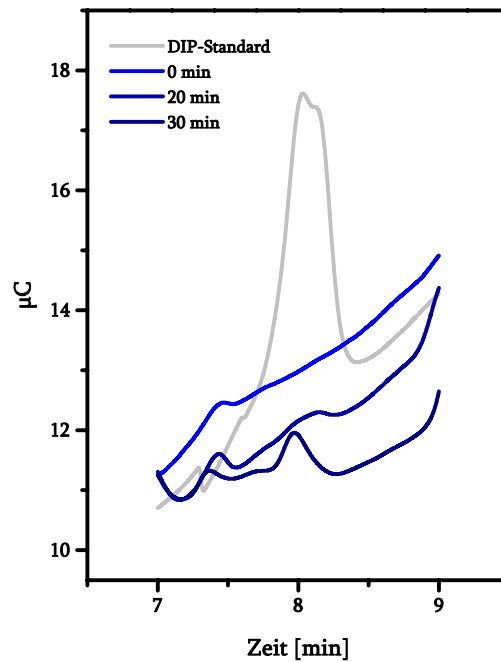


Abb. 3.16.: Darstellung der CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyl-Transferase-Aktivität von PW1116 im gekoppeltem Test mit DIPS: DIP-Produktion nach 0, 20 und 30 min; DIP-Bestimmung über Ionenchromatographie; Test in Gegenwart 10 mM I1P, 2,5 mM CTP, 10 mU IMP 1,5 mU DIPS.

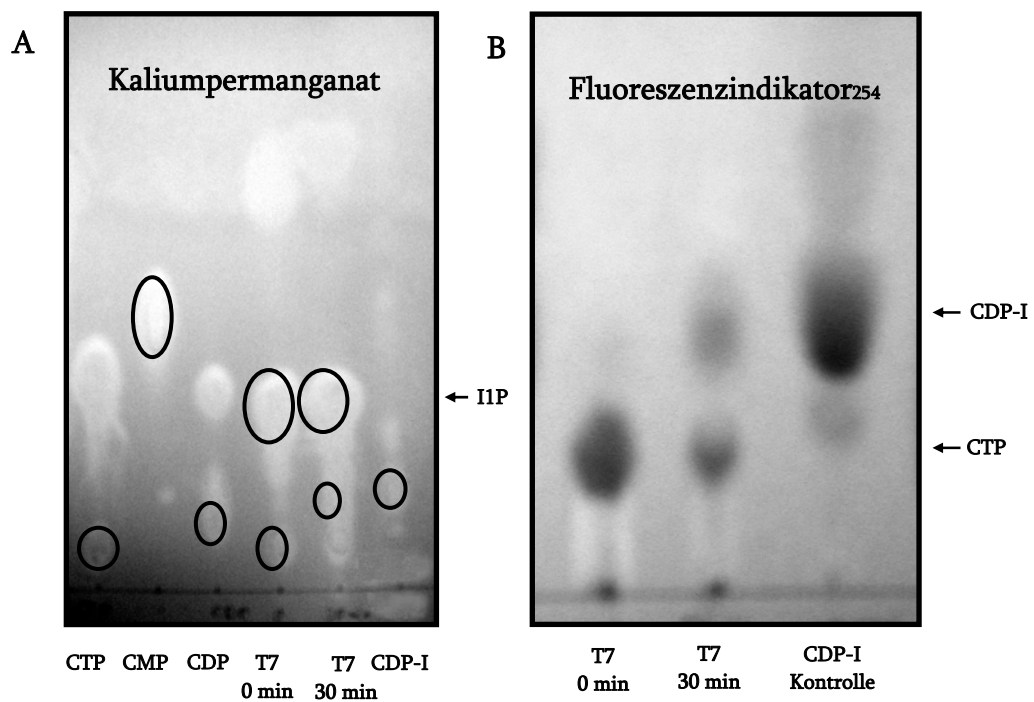
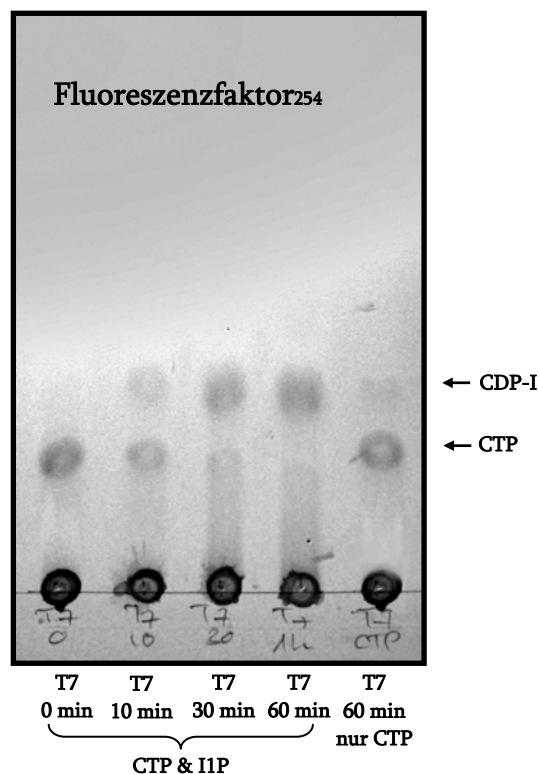


Abb. 3.17.: Nachweis der Bildung von CTP-Inositol-1-phosphat durch Trans7 (PW1116) über Dünnschichtchromatographie: Laufmittel 6:6:2:1 Ethylacetat:Essigsäure:Wasser: Ammoniak; vier Stunden bei Raumtemperatur. Der Reaktionsansatz mit Trans7 beinhaltet 10 mM I1P und 5 mM CTP in 20 mM Tris/HCl pH 8,6 und 10 mM DTT. A: Detektion nach Besprühen der DC-Platte mit Kaliumpermanganat; Spur 1-3 Standards von CTP, CDP und CMP mit je 0,1 µmol. Spur 4-5 Assay mit T7 nach 0 bzw. 30 min. Inkubation. Spur 6: CDP-Inositol Standard. B: Rechter Ausschnitt der gleichen DC-Platte unter UV-Licht.

Für den qualitativen Nachweis der Bildung von CDP-Inositol [12] wurden chromatographische Trennungen über Kieselgel<sub>60</sub> Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub> (Abb 3.17 und Abb 3.18.) durchgeführt (90 µg Gesamtprotein im Test). Die Detektion erfolgte über UV-Licht, Besprühen mit Kaliumpermanganat-Lösung oder Hanes-Reagenz. Wie aus Abbildung 3.18 ersichtlich, konnte eine zeitabhängige Bildung von CDP-Inositol aus Inositol und CTP bei 90°C (Spuren 1-4) und Substratabhängigkeit nachgewiesen werden.



**Abb. 3.18.: Zeitabhängige Darstellung der CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyl-Transferase-Aktivität von Trans7 (PW1116) auf DC-Platte:** Der Reaktionsansatz enthielt 20 mM Tris/HCl pH 8,6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 10 mM I1P, 5 mM CTP und durch Gelfiltration gereinigtes Protein Trans7. Dargestellt ist die zeitabhängige Umsetzung von CTP mit I1P zu CDP-I. Die Reaktion wurde nach 10, 30 und 60 min auf Eis gestoppt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der 60 min bei 90°C ohne I1P inkubiert wurde.

Damit ist belegt, dass die heterolog exprimierte Nucleotidyl-Transferase Trans7 aus *P. woesei* die Umsetzung von *myo*-Inositol-1-phosphat [10] mit CTP [26] zu CDP-Inositol [12] katalysiert.

### 3.5.2.2 Molekulare und katalytische Eigenschaften von Trans1

Als weiteres Beispiel für Nukleotidyltransferasen soll hier die Trans1 beschrieben werden. Es ist aus der Literatur bekannt, dass Proteine bei Verwendung von pET-Vektoren und starker Überexpression die Proteine in so genannten *inclusion bodies* vorliegen.

#### 3.5.2.2.1 Expression der rekombinanten Trans1

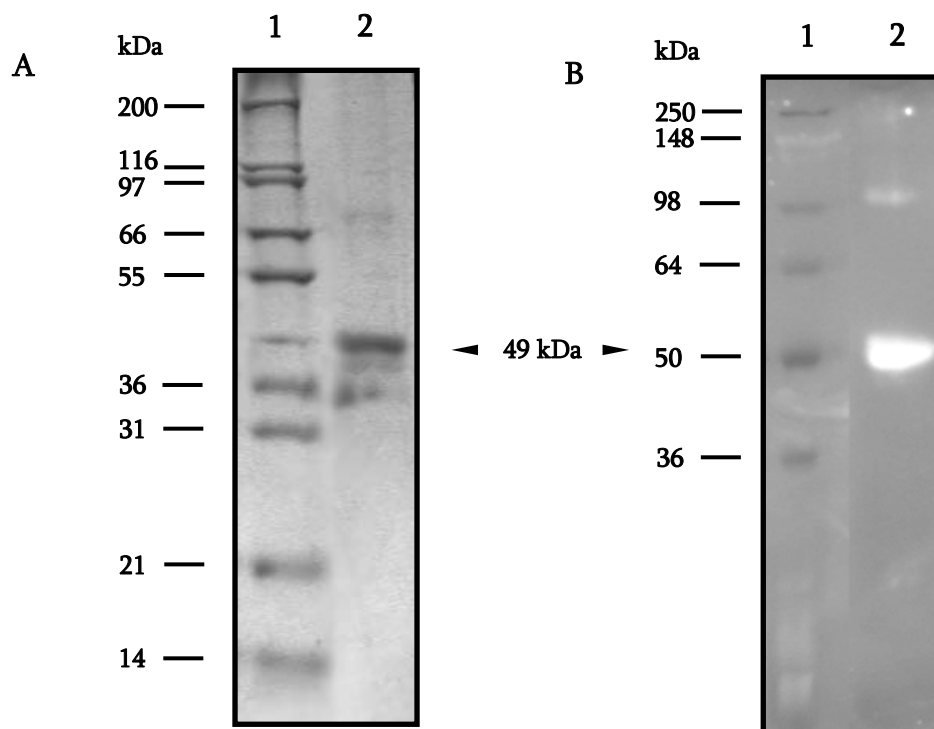
Bei den Klonen Trans1, Trans2, Trans3, Trans4 und Trans8 traten unter Standardexpressionsbedingungen (37°C, Induktion mit 1 mM IPTG bei OD<sub>597</sub>=0,6) *inclusion bodies* auf. Mit dem Ziel, diese Proteinaggregation in Form von *inclusion bodies* zu verhindern, wurden im Fall von Trans1 sowohl Wachstumstemperatur als auch Konzentration des Induktors reduziert sowie die Induktion bei niedrigeren Zelldichten durchgeführt. Dies geschah zur Vermeidung zu hoher Translationsraten, die zu einer Akkumulation von falsch gefalteten Intermediaten führen und damit die Aggregation begünstigen könnten. Folgende Variationen der Expressionsparameter wurden durchgeführt (Tabelle 3.5.).

Tabelle 3.5.: Variationen der Expressionsparameter für die Transferasen 1-8 ohne 7

Vektor	Stamm	Temp.	Induktor	Zelldichte bei Induktion
pET11c	<i>Rosetta</i> (DE3)	37°C	1 mM	0,6
pET11c	<i>Rosetta</i> (DE3)	37°C	0,5 mM	0,6
pET11c	<i>Rosetta</i> (DE3)	37°C	1 mM	0,2
pET15b	<i>Rosetta</i> (DE3)	25°C	1 mM	0,6
pET15b	<i>Rosetta</i> (DE3)	4°C über Nacht	1 mM	0,6
pET11c	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	37°C	1 mM	0,6
pET11c	<i>E. coli</i> BL21(DE3)+LysS	37°C	1 mM	0,6

Keine der durchgeführten Expressionsexperimente führte dazu, dass die Proteine in Lösung gingen. Unter allen Bedingungen lagen sie als *inclusion bodies* vor.

Da trotz verschiedener Expressionsvektoren (siehe Tabelle 3.5.) und Anzuchtbedingungen die Trans1 ausschließlich als unlösliches Protein in *E. coli* exprimiert wurde, konnte das Protein nur in Lösung gebracht werden, indem man es renaturierte. Für die Renaturierung wurde das Protein im aufgefalteten Zustand (6 M Guanidin/HCl und 20 mM DTT) über seinen N-terminalen His-Tag an Ni-NTA gebunden, danach auf der Säule mit Renaturierungspuffer zurückgefaltet und insgesamt 300 mg lösliches Protein eluiert (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20.: Renaturierung von *inclusion bodies* der Trans1:** SDS-PAGE Elektropherogramm (15%); 1: Prestained Proteinstandard ~ 14 bis 200 kDa; 2: Renaturierte Trans1 gelöst in 20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl und 200 mM Imidazol nach Elution von Ni-NTA-Agarose. A: Coomassie gefärbt; B: spezifische His-Tag Protein Detektion mit InVision™ His-tag in *gel stain* (Invitrogen).

### 3.5.2.2.2 Molekülmasse von Trans1

Das Molekulargewicht der Trans1 wurde unter nativen und denaturierenden Bedingungen bestimmt. Für die Untereinheit wurde in der SDS-PAGE eine Molekülmasse von 49 kDa ermittelt, welches mit dem aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Wert von 48,9 kDa übereinstimmt. Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts über Gelfiltration ergab einen Wert von 100 kDa. Offensichtlich bildet Trans1 unter nativen Bedingungen homomere Dimere aus (Abb. 3.22.).

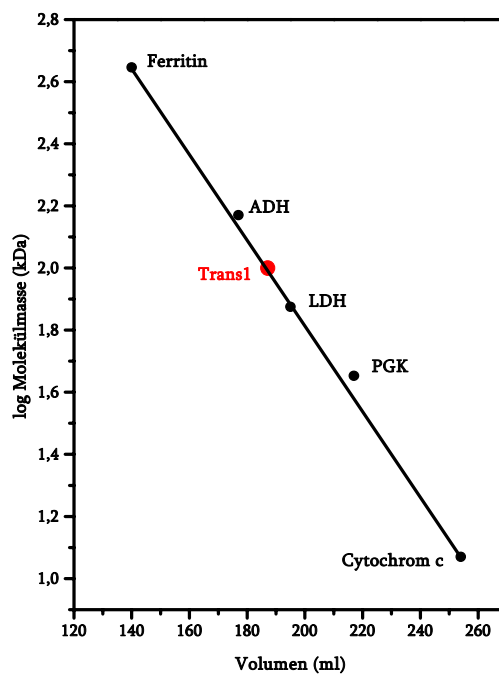
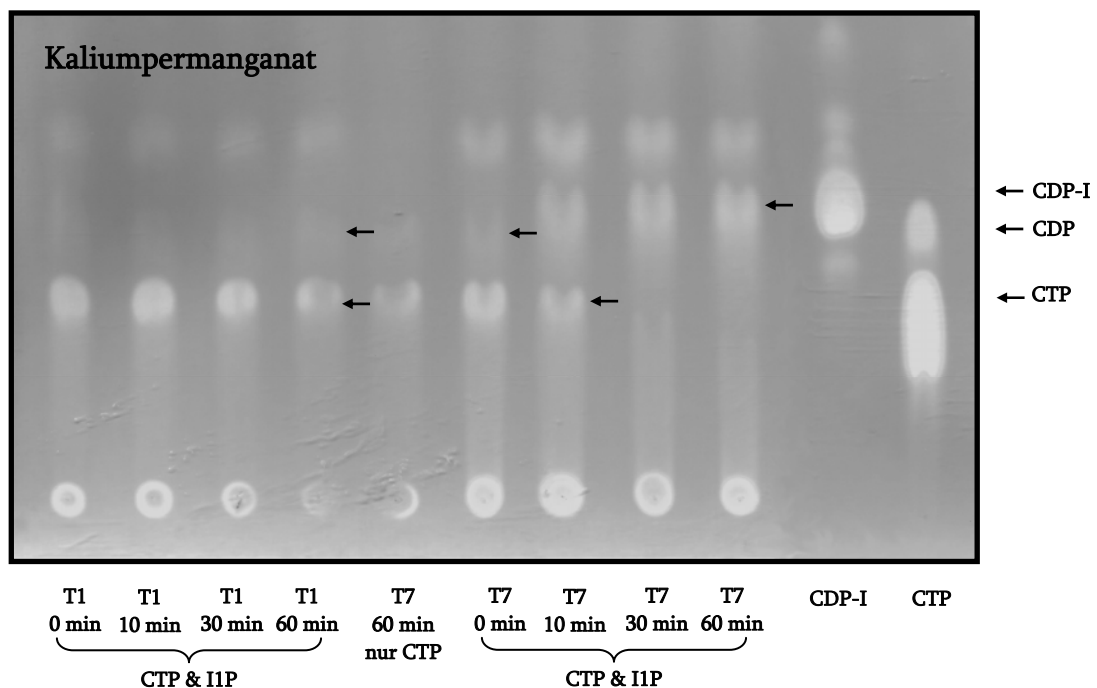


Abb. 3.22.: Bestimmung des molekularen Masse der rekombinanten Trans1 durch Ausschlusschromatographie über HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Amersham Biosciences; Säulenvolumen 330 ml): Molekulargewichte der Referenzproteine: Ferritin (aus Pferdemuskel): 443 kDa; ADH (Alkohol-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*): 148 kDa; LDH (Laktat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*) 78 kDa; Phosphoglyceratkinase 45 kDa; Cytochrom c (aus Rinderherz) 12,5 kDa. Das Molekulargewicht der Trans1 beträgt nach Gelfiltration 100 kDa und ist somit ein Dimer.

### 3.5.2.2.3 Katalytische Eigenschaft des Genprodukts des *P. woesei*-Homologs von PF1116 (PW1116) Trans1

Die Umsetzung von Inositol-1-phosphat mit CTP zu CDP-Inositol durch Trans1 konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Aktivitätsansätze, die chromatographisch auf Dünnschichplatten aufgetragen wurden, ergaben keine *Spots* auf der Höhe von CDP-Inositol im Gegensatz zu Ansätzen, die mit Trans7 durchgeführt wurden (Abb. 3.21.). Die Proteinmenge im Testansatz betrug 5 µg Protein.



**Abb. 3.21.: Zeitabhängige Darstellung der CTP-Inositol-1-phosphat Cytidylyl-Transferase-Aktivität von Trans1 und Trans7 auf DC-Platte:** Der Enzymtest enthielt 20 mM Tris/HCl pH 8,6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 10 mM I1P, 5 mM CTP und durch Gelfiltration gereinigtes Protein Trans1. Dargestellt ist die zeitabhängige Umsetzung von CTP mit I1P zu CDP-I. Die Reaktion wurde nach 10, 30 und 60 min auf Eis gestoppt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der ebenfalls 60 min bei 90°C nur mit CTP inkubiert wurde. Färbung mit Kaliumpermanganat.

### 3.6 Weiterführende Untersuchungen an der rekombinanten *myo*-Inositol-1-phosphat Synthase und der Inositol-Monophosphatase von *P. woesei*

Die an der DIP-Biosynthese beteiligten Enzyme IPS und IMP aus *P. woesei* wurden von Wolff in *E. coli* kloniert und heterolog exprimiert [WOLFF, Dissertation 2001]. Die molekularen Eigenschaften der beiden Enzyme wurden mit hitzegefällten Protein untersucht und ihre Substratspezifität nachgewiesen.

#### 3.6.1 Reinigung der rekombinanten Proteine

Für die Reinigung der rekombinanten IPS und IMP wurden jeweils 1,5 g Zellen (Nassgewicht) der Expressionsklone in 20 mM Tris/HCl pH 8,6 resuspendiert und in der French Press bei 4°C aufgeschlossen. Mittels Ultrazentrifugation wurden die unlöslichen Zelltrümmer abgetrennt und die DNA im Rohextrakt durch Benzonase verdaut. Durch Hitzebehandlung für 30 min bei 90°C und anschließender Zentrifugation, konnten 90% der *E. coli*-Proteine abgetrennt werden. Beide Proteine wurden über die Gelfiltration Superdex 200 Prepgrade bis zur Homogenität gereinigt und danach über Molekularfilter (Vivaspin 5 kDa) auf 250 µl ankonzentriert (Abb. 3.23). Insgesamt konnte aus dem Zellmaterial für beide Enzyme je ca. 3,5 mg homogenes Protein gewonnen werden. Die Proteinkonzentration betrug 15 mg/ml.

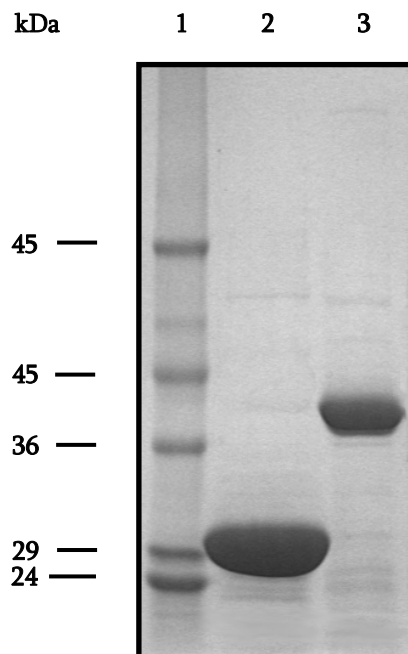
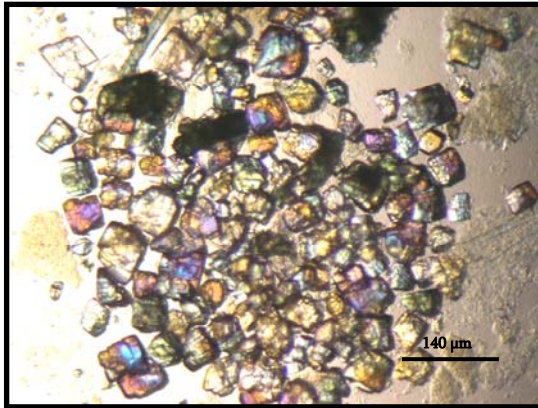


Abb. 3.23.: Reinigung der heterolog exprimierten der *P. woesei* IPS und IMP aus *E. coli* BL21(DE3): SDS-PAGE 10%; Reinigung beider Proteine über Hitzefällung und Chromatographie über Sephadex 200 Prepgrad: Spur 1: Proteinstandard 14 bis 66 kDa; Spur 2+3: IMP, 4 µg; Spur 3: IPS, 4 µg.

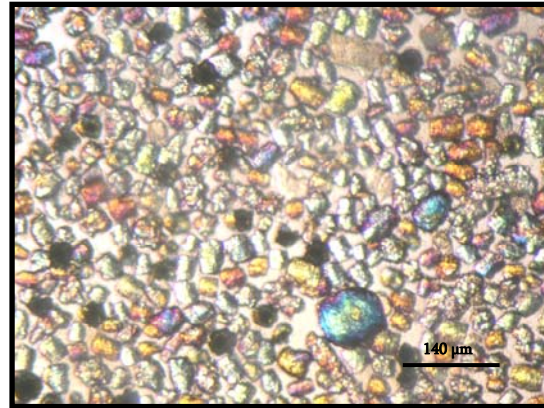
### 3.6.2 Kristallisation von IPS und IMP

Die gereinigten Proteinlösungen wurden im Pre-Crystallization Kit auf ihre Fällungseigenschaften hin überprüft. Die Kristallisationsscreens wurden mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml durchgeführt. 1 µl der Proteinlösungen wurde mit 1 µl der jeweiligen Reservoirlösungen der *Crystal Screens* I und II (Hampton Research) gemischt und gegen die Reservoirlösung äquilibriert. Bereits nach zwei Tagen zeigten die Proteine IPS und IMP erste Anzeichen von Kristallwachstum in Ansätzen auf Tris-Puffer Basis und Salzmischungen aus ein- und zweiwertigen Metallionen mit den Präzipitanten Polyetylglycol 4000 und 8000 (Abb 3.24 bis 3.29). In 2 M Magnesiumformiat zeigte die IPS schon nach zwei Tagen große verwachsene Kristalle, die jedoch für die Röntgenstrukturanalyse nicht zu verwenden waren (Abb. 3.25). Wie durch Anfärben mit 10 % Irid-Lösung gezeigt werden konnte, handelte es sich in allen Fällen um Proteinkristalle (Beispiel Abb. 3.29.). Die IMP bildete in 2 M 0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 15% PEG 4000 Nadeln, die bis zu einer Größe von 80 µm x 450 µm heranwuchsen. Eine kompaktere jedoch verwachsene Form bildete dieses Protein unter 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 11 % PEG 8000. Die durch das systematische Screening erhaltenen, vorläufigen Kristallisationsbedingungen wurden durch systematische Variation von verschiedenen Parametern (Proteinkonzentration, pH-Wert, Art und Konzentration des verwendeten Fällungsmittels sowie die Zugabe von Additiven) verfeinert. Für den Additiv-Screen (Hampton Research) wurden 96 verschiedene Additive verwendet. Im Falle der IPS wurde mit 2 M Magnesiumformiat und 0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 15% PEG 4000 als Präzipitanten getestet. 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 % PEG 8000 wurde hingegen für die IMP verwendet. Mit 100 mM Guanidin/HCl konnte die Bildung von verwachsenen Kristallclustern unterdrückt werden (Abb 3.28 und 3.29). Die Kristalle der IPS wurden durch Verdünnung des Proteins auf 2 mg/ml und Seeding in 2 M Magnesium-Formiat geglättet (Abb 3.28). Die Diffraktionsuntersuchungen der Kristalle von IPS und IMP wurden am Max Planck Institut Dortmund durchgeführt. Die kubischen Kristalle der IMP nach Additiv-Screen streuten im Röntgenstrahl nicht, was vermutlich auf die zu geringe Größe zurückzuführen ist (70 µm x 70 µm). Eine nennenswerte Streuung konnte bislang nur an den in 0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 35% PEG 4000 gewachsenen Nadeln der IMP festgestellt werden (8,4 Å). Die Kristalle der IPS zeigten auch bei verschiedenen Gefrierschutzmitteln keine Diffraktion. Für eine bessere Auflösung müssen die Proteinkristalle in ihrer Struktur noch verbessert werden.





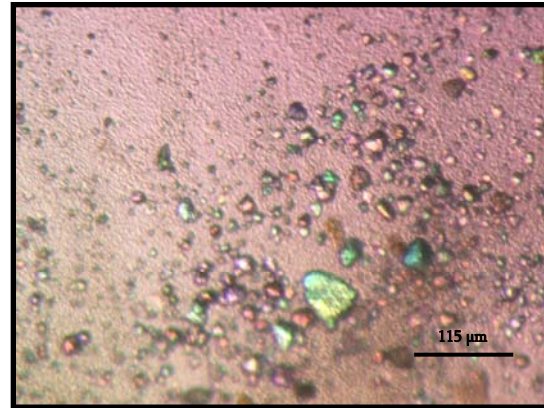
**Abb. 3.24.:** Kristalle der IPS in 0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 15% PEG 4000. Wachstum nach zwei Wochen. Kubisch mit unscharfen Kanten. Tropf 4 µl Proteinlösung+ 4 µl Präzipitant, 20 °C.



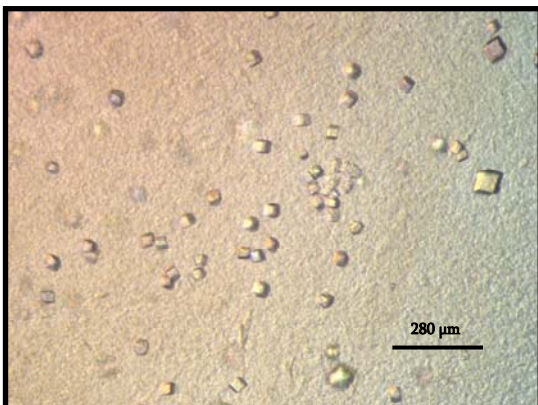
**Abb. 3.25:** Kristalle der IPS in 2 M Mg-Formiat. Wachstum nach zwei Tagen. Kubisch mit unscharfen und teilweise scharfen Kanten. Tropf 4 µl Proteinlösung+ 4 µl Präzipitant, 20 °C.



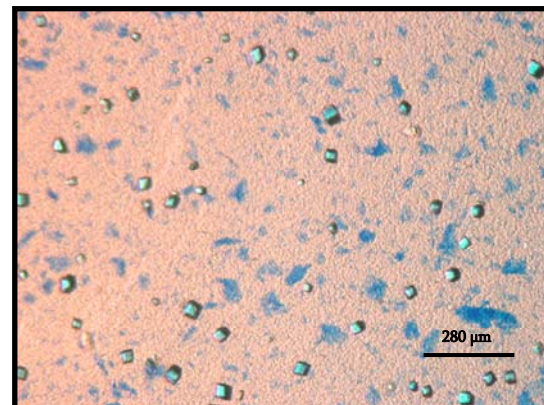
**Abb. 3.26.:** Kristalle der IMP in 0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 15% PEG 4000. 80 µm x 250 µm lange Nadeln, oft verwachsen. Tropf 4 µl Proteinlösung+ 4 µl Präzipitant, 20 °C.



**Abb. 3.27.:** Kristalle der IMP in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM ZnCl, 100 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 % PEG 8000. Tropf 4 µl Proteinlösung+ 4 µl Präzipitant, 20 °C.



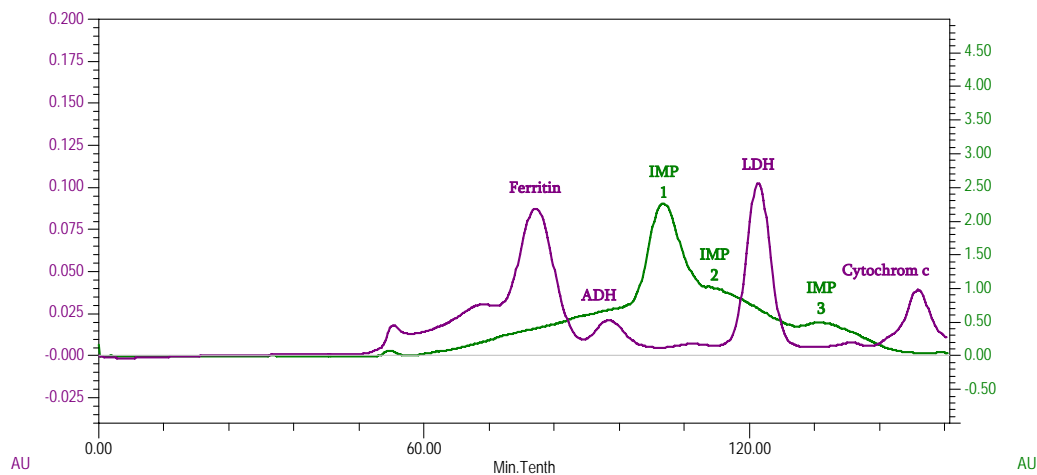
**Abb. 3.28.:** Verbesserte kubische Kristalle der IMP durch Additiv-Screen. Nach zwei Tagen gewachsen in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM ZnCl, 100 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 % PEG 8000 mit 100 mM Guanidin/HCl als Additiv. Tropf 4 µl Proteinlösung+ 4 µl Präzipitant, 20 °C.



**Abb. 3.29.:** Kristalle der IMP aus Abb 3.28. gefärbt mit Izid (Hampton, Farbstoff) zur Identifizierung der Proteinkristalle. Tropf 4 µl Proteinlösung+ 4 µl Präzipitant, 20 °C.

### 3.6.3 Untersuchungen zur Molekülmasse und Enzymatik der IMP

Die apparente Molekülmasse der rekombinanten IMP von *P. woesei* wurde durch Gelfiltration bestimmt. Das Chromatogramm lässt erkennen, dass die IMP in einem Bereich von 30 bis 300 kDa mit einem Maximum bei 120 kDa eluiert (Abb. 3.30.): Das Profil des Chromatogramms deutet darauf hin, dass das Protein in einer Mischung verschiedener Oligomere vorliegt. Legt man die molekulare Masse der Homomeren mit 30 kDa zugrunde (berechnete molekulare Masse/SDS-PAGE), so kann man auf eine Mischung aus Mono-, Di- und Tetrameren rückschließen. Die Ausbildung von drei Peaks könnte darauf hindeuten, dass es sich hier um ein relativ „lang-sames“ Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht handelt.



**Abb. 3.30.: Elutionsprofil der Hitzeprezipitierten rekombinanten IMP von *P. woesei* über HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Amersham Biosciences; Säulenvolumen 330 ml):** Lila: Elutionsprofil der Referenzproteine Ferritin (aus Pferdemuskel): 443 kDa; ADH (Alkohol-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*): 148 kDa; LDH (Laktat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*): 78 kDa; Cytochrom c (aus Rinderherz) 12,5 kDa. Grün: Elutionsprofil der IMP mit Peaks bei 120, 90 und 30 kDa

Substrat-Spezifitätstests bei 90°C mit G6P, FBP, F6P und DIP zeigten, dass die IMP von *P. woesei* sowohl I1P als auch FBP dephosphoryliert wie die Enzyme aus *Archaeoglobus fulgidus* [CHEN et al., 2000] und *Methanococcus janaschii* [STIEGLITZ et al., 2003]. Die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  für FBP wurden im enzymatisch gekoppelten Test bei 50°C ermittelt. Der apparente  $V_{max}$  - Wert beträgt für die Dephosphorylierung von FBP 1,4 U/mg und der apparente  $K_m$  0,49 mM (Abb. 3.31.). Die Reaktion ist ebenso wie die Dephosphorylierung von I1P abhängig von der Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und zeigt ein hyperbolisches Sättigungsverhalten mit  $K_m = 0,53$  mM und  $V_{max} = 1,1$  U/mg.

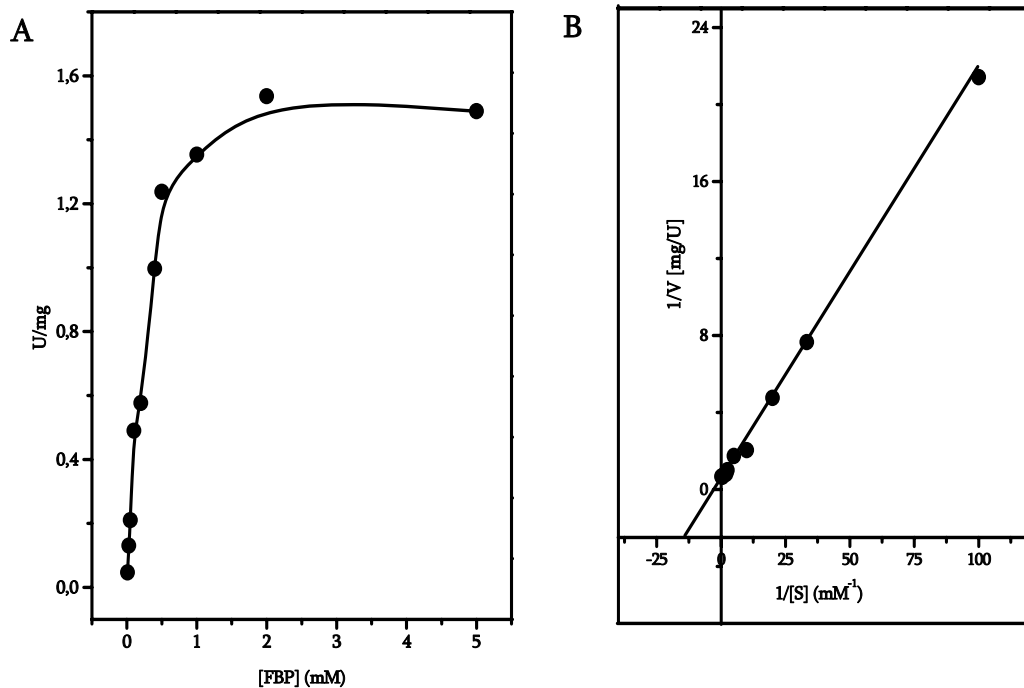


Abb. 3.31.: Bestimmung der FBPase Aktivität der rekombinanten IMP von *P. woesei*. A: spezifische Aktivität der IMP bei 50°C in Abhängigkeit von der Fruktose-1,6-bisphosphat-Konzentration. B: doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  (U/mg) gegen die Substratkonzentration (mM) nach Lineweaver-Burk. Testbedingungen: 2 mM NADP, 70  $\mu$ g Protein, 5 U G6PDH, 5 U GPI, 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

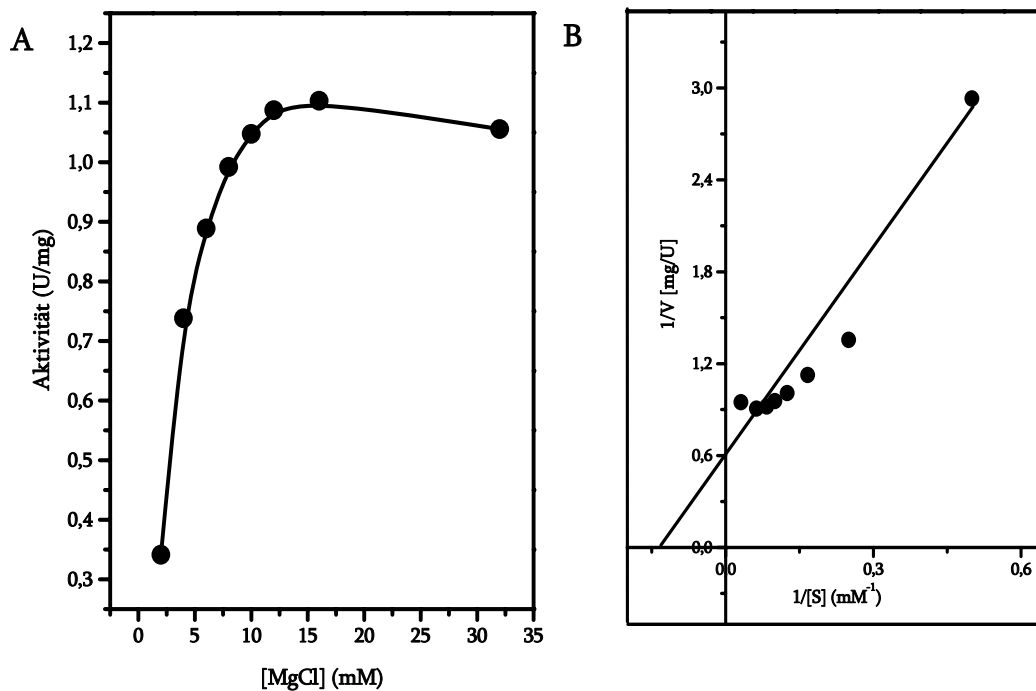


Abb. 3.32.: Bestimmung der FBPase Aktivität der IMP aus *P. woesei*. A: spezifische Aktivität der IMP bei 50°C in Abhängigkeit von der MgCl-Konzentration. B: doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  (U/mg) gegen die Substratkonzentration (mM) nach Lineweaver-Burk. 2 mM NADP, 70  $\mu$ g Protein, 5 U G6PDH, 5 U GPI und 5 mM FBP

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Produktion von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat im Technikumsmaßstab

#### 4.1.1 Kontinuierliche Fermentation von *P. furiosus*

Die biotechnologische Herstellung rekombinanter Produkte hat in der modernen Pharmaindustrie und Biotechnologie in den letzten Jahren einen breiten Stellenwert eingenommen. Jedoch verlieren neben der Schaffung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) zur Produktion rekombinanter Proteine und Substanzen die Produktionsverfahren, die auf der Syntheseleistung von „natürlichen“ Organismen beruhen, nicht an Bedeutung. Als Beispiel für diese eher konventionelle Produktion ist die Fermentation und Extraktion der kompatiblen Solute wie Ectoin [1] und Hydroxyectoin aus *Halomonas elongata* zu nennen. Ectoin schützt die Zellen vor schädlichen Einflüssen wie UV-Strahlung, Trockenheit und zu hohen Salzkonzentrationen und sichert somit diesem Bakterium das Überleben. Es stabilisiert die natürlichen Strukturen der Biopolymere wie Proteine, Nukleinsäuren sowie Biomembranen, die die Zellhülle des Bakteriums bilden [GALINSKI & SAUER, 1998]. Im Rahmen des Zukunftswettbewerbs Ruhrgebiet (Projekt "Heisse Biochemie", Fördervolumen 3,4 Mio €) sollten in Zusammenarbeit mit der Firma bitop weitere innovative Produkte aus Extremophilen entwickelt und produziert werden. Hierzu bot sich das in der Arbeitsgruppe Hensel 1991 entdeckte Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (DIP) [8] an [SCHOLZ et al., 1992]. Es ist das thermokompatible Solut des hyperthermophilen Archaeums *Pyrococcus*. Hierzu sollte ein effizientes Kultivierungsverfahren zur Produktion von DIP [8] etabliert werden [RINKER et al., 1999].

Die Produktion von DIP [8] unterteilt sich in einen *Upstream*-Prozess und einen Aufreinigungs- oder *Downstream*-Prozess. Im Rahmen des *Upstream*-Prozesses erfolgte die Anzucht des Produktionsstammes *P. furiosus* aus Zellkulturen der Firma bitop. Die Produktion von DIP [8] verläuft proportional zur Zelldichte bei Wachstum von *Pyrococcus furiosus* über dem Temperaturoptimum [CHEN et al., 1998]. Somit musste zunächst *Pyrococcus* in hohen Zelldichten kultiviert werden. Nach Produktion der Zellen erfolgten im *Downstream*-Prozess die Extraktion und Aufreinigung von DIP sowie die bioanalytischen Prüfungen und galenische Formulierung des Produktes. Nach Entnahme und Anzucht zu einer Arbeitskult in flüssiger Kultur erfolgte sukzessives *Scaling Up* von Serumflaschen zum 30 l Bioreaktor. Idealerweise sollte nur mit einer Zelllinie im Produktionsbereich gearbeitet werden, um Fremd- oder Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Im Fall von *P. furiosus* konnte im Technikum der Firma bitop parallel *Halomonas* und der thermophile *Rodothermus* gezogen werden, da aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsoptima und Salzbedarf gegenseitige Kontaminationen ausgeschlossen waren.

Die Kultivierung von *P. furiosus* wurde unter optimalen Bedingungen für Wachstum und Produktbildung durchgeführt, wie von Raven 1992 beschrieben [RAVEN et al., 1992]. Nur die Kohlenstoffquelle wurde dahingehend verändert, dass an Stelle der teuren Maltose auf einen Zusatz der Bierherstellung dem Malzextrakt zurückgegriffen wurde. Es konnten dadurch nicht nur die Kosten gesenkt, sondern auch die Zellausbeute auf 500 g Feuchtzellen/Tag (entspricht einer durchschnittlichen Zelldichte von  $1 \times 10^{10}$  Zellen/ml) erhöht werden.

Je nach Anforderungen des zu kultivierenden Organismus sind verschiedene Bioreaktorsysteme zu wählen. Prokaryonten mit einer stabilen Zellwand können in Bioreaktoren mit Rührwerken kultiviert werden, da sie wenig empfindlich gegenüber den entstehenden Scherbewegungen sind. *Pyrococcen* besitzen als Zellhülle einen S-Layer und sind eher empfindlich gegenüber physikalischen Einwirkungen, weshalb der verwendete Bioengineering-Reaktor zu einem Airlift-Bioreaktoren umgebaut wurde [RAVEN et al., 1992]. Bei diesem Airlift-Bioreaktor wurde bodenständig das  $N_2/CO_2$ -Gemisch eingeblasen, das durch eingesetzte Prallbleche zu einer Konvektion des Flüssigmediums führte.

Die extremen Umgebungstemperaturen bewirken chemische Veränderungen der Nährlösung (z.B. Aminosäuren und Zucker durch Bildung von Maillard-Produkten [BELITZ & GROSCH, 1992; KRAHE et al., 1996]), die das Wachstum beeinträchtigen [LAMOSA et al., 1998]. Der kontinuierliche Fermenter stellt eine Kultivierungsvariante dar, bei der es möglich ist, einer gewachsenen Kultur frisches Substrat gleich bleibend zuzuführen. Hemmende Stoffwechselprodukte können daher nicht angereichert werden, und die maximale Zelldichte im Reaktor kann sogar gegenüber einer konventionellen Batch-Fermentation gesteigert werden. Diese Variante des Reaktors erlaubt neben dem Dialysereaktor [KRAHE et al., 1996] die höchsten Zellerträge von  $3,2 \times 10^{10}$  Zellen/ml für *Pyrococcus furiosus* [RAVEN et al., 1992]. Allerdings konnte trotz guter Durchmischung und kontinuierlichen Zufuhr frischen Mediums der kontinuierliche Betrieb nur für maximal vier Wochen aufrechterhalten werden, bevor der Reaktor neu aufgesetzt werden musste. Gründe für die begrenzte Kontinuität der Fermentation könnten in kleinen nicht erfassten Diskontinuitäten der Prozessführung liegen, die zu Stressreaktionen und Autolyse der Zellen führen.

Im Rahmen des Betriebs- und Produktionsablaufes musste gemäß der QA (*quality assurance*) mit SOP's (*standard operation procedures*) die Medienzusammensetzung validiert werden, ebenso wie Lagerung und Kultivierung der Stammkultur, die Fermentationsbedingungen, Ernte der Zellmasse, Bevorratung an Gasmengen und *Feed*-Lösungen und Durchführung von Dekontaminationen oder Desinfektionen von Vorlagebehältern und Verschlauchungen. Ebenso musste der gesamte Fermentationsprozess durch Dokumentation der Produktionsparameter wie beispielsweise Temperatur, pH-Wert, Prozessdauer und eingesetzte Substrate be-

schrieben werden (siehe Anhang Arbeitsanweisungen). Tägliche In-Prozess-Kontrollen des gebildeten DIPs [8] und Firoins [4] über Ionenchromatographie belegten die tatsächliche Qualität und Quantität der Stoffwechselprodukte.

#### 4.1.2 Extraktion von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat

Die Gewinnung des gewünschten Endproduktes aus einem Kulturansatz wird in der Gesamtheit aller Arbeitsschritte als *Downstream*-Prozess bezeichnet [GAVRILESCU & CHISTI, 2005]. Zu diesen Arbeitsschritten wird in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie die Gewinnung, Isolierung, Aufreinigung, Formulierung und Konfektionierung eines Fermentationsproduktes zum fertigen Endprodukt gezählt. Alle Aufarbeitungsschritte müssen auch hier validiert sein und für die Zulassungsbehörden und zur eigenen Sicherheit des Unternehmers dokumentiert werden.

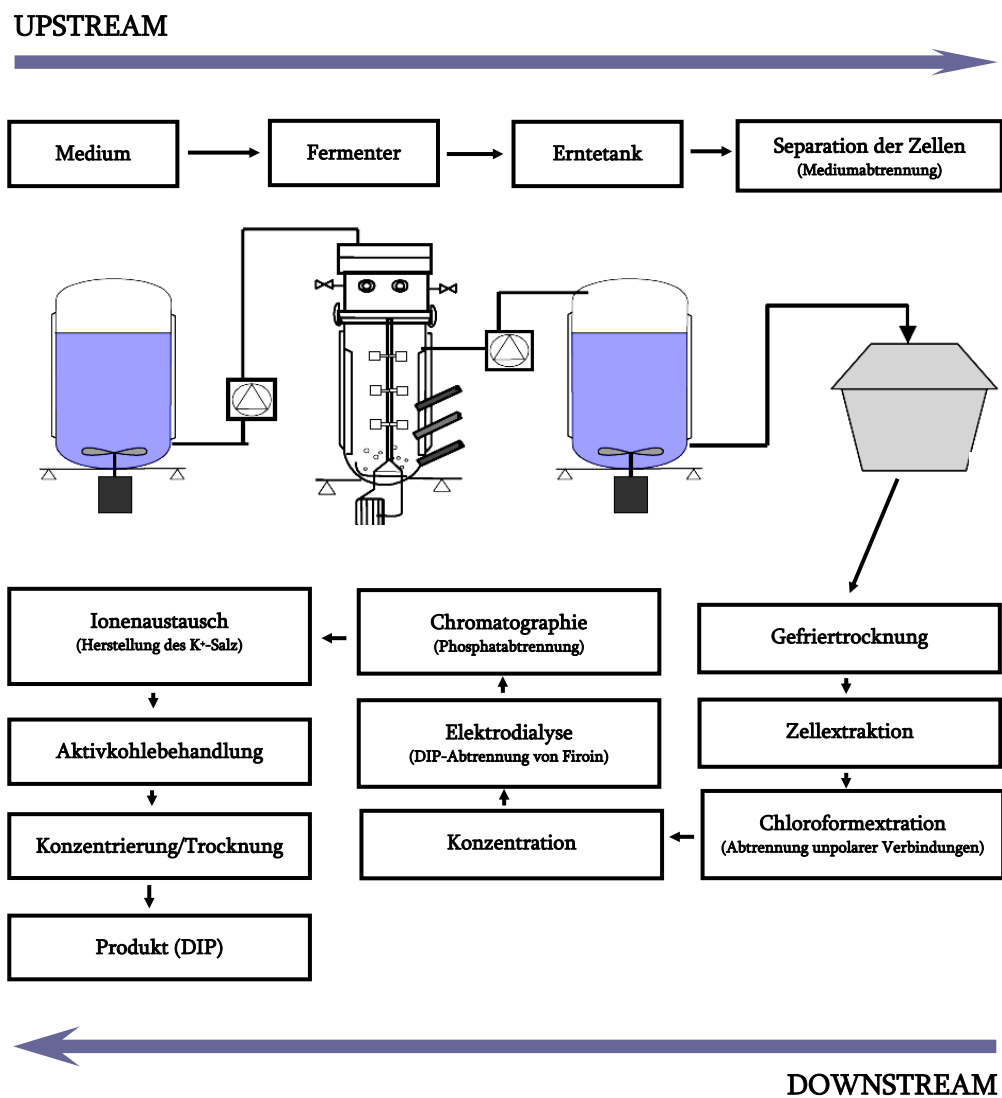


Abb. 4.1.: Prinzip des DIP-Produktions Prozesses: *Up*- und *Downstream*-Prozess der DIP-Produktion. Fermentation der Zellen wird als *Upstream* bezeichnet, die Aufarbeitung bis zum Produkt DIP als *Downstream*.

Verglichen mit dem Dreischritt-Verfahren, das von Wolff [WOLFF, Dissertation 2001] beschrieben wurde, konnte durch den mehrstufigen *Downstream*-Prozess (Abb. 4.1.) eine höhere Ausbeute pro Zellmasse erzielt werden statt 1 mg/g Zellmasse 3,3 mg/g Zellmasse. Eine wichtige Stufe stellte dabei die Elektrodialyse dar, durch die DIP [8] von Firoin [4] getrennt werden und letzteres auch weiter bearbeitet werden konnte. Für kompatible Solute aus Extremophilen gibt es schon seit längerem industrielle Applikationen. Niedermolekulare Substanzen aus halophilen Bakterien sind exzellente Stabilisatoren für Biomoleküle [DA COSTA et al., 1998; WELSH 2000; SANTOS & DA COSTA 2001]. Ectoin [1] und dessen Derivate (Poduzent bitop) sind patentiert als Feuchtigkeitsspender und Zellschutzkomponenten in Gesichtscremes [MONTITSCHKE et al., 2000], werden aber auch als Stabilisatoren für die PCR eingesetzt [SAUER & GALINSKI, 1998]. Für DIP [8] konnte ebenfalls eine stabilisierende Wirkung auf einige Proteine nachgewiesen werden. Die Lieferung von 100 g DIP [8], neben cDPG [7], Firoin [4] und Diglycerolphosphat [5] an die Firma Merck (VWR-International, Darmstadt) diene der weiteren Validierung dieser Substanzen als neue Produkte für die Kosmetikindustrie und möglicherweise für die Anwendung als Pharmaprodukte.

## 4.2 Enzymatik des Biosynthesewegs von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat

Das übergeordnete Ziel ist es, in Zukunft einen rekombinanten Produktionsstamm zu entwickeln, der Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat hoch-effizient produziert, um Fermentationskosten, Arbeitsaufwand und Zeit einzusparen. Voraussetzung hierfür ist die Identifizierung der noch fehlenden Enzyme des Synthesewegs sowie die Überexpression der codierenden Gene.

Wie aus den Arbeiten von SCHOLZ et al. (1998), CHEN et al. (1998) und WOLFF (Dissertation, 2001) zu entnehmen ist, treten als Intermediate des DIP-Synthesewegs Glucose-6-phosphat [9], Inositol [11], Inositol-1-phosphat [10] und CDP-Inositol [12] auf. Die Herstellung von Inositol-1-phosphat [10] erfolgte biochemisch durch die Umsetzung von Glucose-6-phosphat [9] durch das rekombinante Enzym IPS aus *P. woesei*. Daraus konnte nachfolgend über chemische Synthese CDP-Inositol [12] generiert werden [ROSEMAN et al., 1961]. Die Bildung und Reinheit beider Substanzen wurde über Ionen-, Dünnschichtchromatographie und NMR nachgewiesen.



### 4.2.1 Anreicherung der Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat Synthase

Wie schon bei Wolff [WOLFF, Dissertation 2001] beschrieben, konnte die Aktivität der Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat Synthase nachgewiesen werden. Allerdings bereitete die Anreicherung des Enzyms erhebliche Schwierigkeiten, da es schlechte Bindungseigenschaften gegenüber gängigen Chromatographiematrizes aufwies. Das Protein konnte nur durch Ausschlussverfahren angereichert werden. Auch die von Wolff beschriebene Interaktion zwischen der IMP und der DIPS konnte nicht für eine Reinigung der DIPS ausgenutzt werden.

Dennoch konnte eine ca. 100fache Anreicherung des Proteins erzielt werden und die Anzahl der in SDS-Gelen sichtbaren Proteine, die als Kandidaten für eine DIPS in Frage kommen könnten, eingeschränkt werden. Allerdings konnte der begründete Verdacht, ein ca. 150 kDa großes Polypeptid könnte für die DIPS-Aktivität in *P. woesei* verantwortlich sein, nicht bestätigt werden. So exprimiert das für dieses Protein codierende Gen ein Genprodukt, das nicht die gewünschte Aktivität zeigt. Gründe für diesen Misserfolg könnten sein:

- I. Das verdächtige Protein hat gar nichts mit der Synthese von DIP zu tun;
- II. Das Protein ist tatsächlich die gesuchte DIPS, benötigt allerdings für seine Aktivität zusätzliche chemische Modifikationen wie Glycosylierung [NELBOEK et al., 1998], Methylierung, Acetylierung etc, die im *E.coli*-Expressionssystem nicht möglich sind;
- III. Das Protein ist Teil eines oligomeren heteromeren Komplexes und benötigt eine Interaktion mit weiteren Polypeptiden.

Diese Erklärungsmöglichkeiten können geprüft werden durch (I) Versuche zur weiteren Reinigung des Proteins, (II) durch massenspektrometrische Vergleiche zwischen der Proteinspecies aus *P. woesei* und dem rekombinanten Protein oder durch (III) gleichzeitige Aufreinigung von eventuell assoziierten Proteinen über Immunopräzipitation mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das 150 kDa Protein gerichtet sind. Letzteres wurde bereits erfolgreich für den 240 kDa Exosom-ähnlichen Komplex Rrp41 aus *Sulfolobus solfataricus* angewendet [EVGUENIEVA-HACKENBERG et al., 2003]

### 4.2.2 Molekulare Eigenschaften der IMP

Besondere Aufmerksamkeit verdient die Struktur und Funktion der IMP von *P. woesei*. Wie Untersuchungen von Wolff (Dissertation, 2001) zeigten, interagiert dieses Protein mit der DIPS. Diese Interaktion ist die Voraussetzung für die Synthese von DIP in *P. woesei*. Interessanterweise scheint diese Interaktion bei dem sehr nahe verwandten *P. furiosus* nicht vorzuliegen [CHEN et al., 1998]. Offenbar sind nur sehr kleine Strukturänderungen für dieses unterschiedliche Verhalten



verantwortlich. Dies wäre eine sehr reizvolle Fragestellung nicht nur unter Aspekten der Struktur-Funktionsbeziehung sondern auch unter Gesichtspunkten der Regulation des Syntheseweges.

Bislang konnten vier IMP-Enzyme aus hyperthermophilen Organismen, drei von ihnen aus Archaea charakterisiert werden (Tabelle 4.2.). Auffallend ist, dass die Enzyme der hyperthermophilen Archaea neben der Dephosphorylierung von IIP auch die Dephosphorylierung von FBP mit ähnlicher Effizienz katalysieren. Der Verdacht besteht, dass diese Enzyme in den Organismen verschiedene Funktionen übernehmen.

**Tabellen 4.2.: *myo*-Inositol-Monophosphatasen:** Die Mehrzahl der IMP-Enzymhomologen sind in der Tabelle dargestellt. Referenzen: [CHEN & ROBERTS, 2000], [Nigou et al., 2002] und [WOLFF, Dissertation 2001]

Organismus	Substrat	K <sub>m</sub> [mM]	Temperatur	Oligomer
<i>Methanococcus janaschii</i>	<i>myo</i> -Inositol 1-phosphat Fruktose-1,6-bisphosphat	0,091 0,038	85°C	Dimer
<i>Archeoglobus fulgidus</i>	<i>myo</i> -Inositol 1-phosphat Fruktose-1,6-bisphosphat	0,11 0,08	85°C	Dimer
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>myo</i> -Inositol 1-phosphat Fruktose-1,6-bisphosphat	0.13 n.b.	95°C	Tetramer
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>myo</i> -Inositol 1-phosphat Fruktose-1,6-bisphosphat	0.177 —	pH 8.5, 37°C	Trimer
<i>Pyrococcus woesei</i>	<i>myo</i> -Inositol 1-phosphat Fruktose-1,6-bisphosphat	0,9 0,49	95°C 50°C	Tetramer

Um die Funktion von Enzymproteinen und ihre Regulation zu verstehen, ist die Aufklärung ihrer 3-D-Struktur unerlässlich. In dieser Arbeit wurden Versuche unternommen, die rekombinante IMP und IPS zu kristallisieren und damit die Basis für eine entsprechende 3-D-Struktur-Analyse zu legen. Beide Enzyme sind an Wachstumstemperaturen von 100°C angepasst und sollten damit nicht nur den funktionellen Aspekt hinaus auch wertvolle Hinweise auf die intrinsischen Faktoren der Thermostabilität. Einkristalle der IPS und IMP mit glatten Kanten konnten nur durch Zusätze von Additiven wie Glucose-6-phosphat für die IPS und Guanidin/HCl für die IMP erzeugt werden. Aus einem Beugungsmuster könnte anschließend die Kristallstruktur berechnet werden. Die Kristalle der IPS und IMP zeigten keine hohe Streufähigkeit, was auf ihren Anteil an Wasser und ihre noch zu gerin-

ge Größe zurückzuführen ist. Nach der röntgendiffraktometrischen Untersuchung der Kristalle von IPS und IMP könnte die Struktur der Enzyme mit Hilfe der vorhandenen Strukturdaten der Homologen aus *Archaeoglobus fulgidus* und *Methanococcus jannaschii* [JOHNSON et al., 2000; STEC et al., 2000] durch *molecular replacement* ermittelt werden [GRUND et al., 1980]. Schließlich wird durch die Verwendung der Phaseninformationen dieser Strukturen unter Umständen die zeitaufwendige Lösung des Phasenproblems unnötig.

### 4.3 Identifizierung von Nucleosiddiphosphat-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferasen

Ebenfalls in dieser Arbeit sollte eine Charakterisierung der an dem DIP-Syntheseweg beteiligten Nucleosiddiphosphat-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferase vorgenommen werden.

Die vielen verschiedenen aktivierten Glykosyldonatoren, die in allen zuckerbasierten Stoffwechselwegen vorkommen, werden durch die Enzymklasse der Zucker-Nukleotidyltransferasen synthetisiert. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von Nucleosiddiphosphatzuckern aus Zuckerphosphaten und Nucleosidtriphosphaten unter Abspaltung von Pyrophosphat. Nach unseren Vorstellungen nimmt an der DIP-Biosynthese eine Zucker-Nukleotidyltransferase einen entscheidenden Platz zur Bereitstellung des aktivierten Inositol-1-phosphats [10] ein. In der Arbeit von Scholz [SCHOLZ et al., 1998] konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung weitgehend unabhängig vom verwendeten Nucleotidtriphosphat ist. Die vorliegenden Untersuchungen basierten jedoch auf CTP [26], da als Vorstufe zur chemischen Synthese des aktivierten Inositol-1-phosphats, das als Substrat für die DIPS diene, [12] nur Cytidin-5'-phosphor-morpholidat [13] käuflich zu erwerben war (inzwischen nicht mehr erhältlich) [WOLFF, Dissertation 2001; ROSEMAN et al., 1961]. Entsprechend wurde alle enzymatischen Test auch der Nucleosiddiphosphat-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferasen mit CTP und IIP als Substrate durchgeführt.

Für die Identifizierung der Nucleosiddiphosphat-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferasen wurde darauf verzichtet, das Enzym aus *P. woesei* zu isolieren, da die Produkte der Nachweisreaktionen je nach Anwesenheit von IMP und DIPS, und damit abhängig vom Reinigungsverlauf, unterschiedlich ausfallen (NDP-Inositol ohne IMP bzw. DIP und DIP bei Anwesenheit von IMP und DIPS).

Deshalb wurde ein alternatives Verfahren bevorzugt, das von Genen des sequenzierten *P. furiosus*, die als Zucker-Nukleotidyltransferasen annotiert waren. Durch Amplifikation der homologen Gene in *P. woesei* sollten dann die rekombinanten Genprodukte auf ihre Funktion als Nucleosiddiphosphat-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferasen über den Assay mit CTP und IIP als Substrate nachgewiesen werden. Von den insgesamt sechs Genen, die in *E. coli* zur Expression gebracht

wurden konnte nur bei einem Genprodukt eines Gens Trans7 die Funktion als Nucleosiddiphosphat-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferase über den Enzymtest mit CTP und IIP als Substrate nachgewiesen werden.

In den Fällen von Trans1-Trans5 und Trans8 verhinderte die Bildung von *inclusion bodies* den Funktionsnachweis. Trotz umfangreicher Variationen der Expressionsparameter (Tabelle. 3.5, Seite 61) gelang es nicht, die Bildung von *inclusion bodies* zu verhindern.

Mit gewissem Erstaunen mussten wir allerdings zur Kenntnis nehmen, dass es der Arbeitsgruppe von Pohl (*Department of Chemistry and Plant Sciences Institute, Iowa State University, USA*) gelang die Transferase Trans1 und Trans5 in löslicher Form zu exprimieren und ihre Aktivität nachweisen konnten [MIZANUR et al., 2004A MIZANUR et al., 2005]. Möglicherweise liegt die Ursache für die Expression aktiver Enzyme in der Wahl eines anderen Expressionsvektors pET21a. Renaturierungsversuche mit Trans1 (Expression mit His-Tag in *inclusion bodies*, Solubilisierung dieser, Bindung an Ni-NTA und Renaturierung auf der Säule) erbrachten ein lösliches Protein, allerdings ohne Aktivität.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Produktion von Di-*myo*-Inositol-1,1-phosphat [8] im Gramm-Maßstab konnte erfolgreich ein Up- und Downshift-Prozess für *Pyrococcus furiosus* bei der Firma bitop AG in Witten-Annen etabliert werden. Hierzu wurde ein 30 l Bioengineering-Reaktor als Chemostat bei 98°C über vier mal vier Wochen kontinuierlich betrieben. Aus 7,5 kg Trockenzellmasse konnten 100 g DIP aufgearbeitet werden. Für eine Kostenminimierung der DIP-Produktion sollte ein rekombinanter Produktionsstamm angestrebt werden. Hierzu wurden an der Universität Duisburg-Essen Versuche zur Identifizierung und Charakterisierung der im DIP-Syntheseweg noch fehlenden Enzyme, NTP-Inositol-1-phosphat Nucleotidyltransferase und Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat Synthase, durchgeführt.

Die vergleichende Analyse der SDS-Gel-Elektropherogramme der verschiedenen Reinigungsfraktionen legte nahe anzunehmen, dass ein 150 kDa Protein die DIPS darstellt. Partielle Sequenzierung ließ erkennen, dass das Protein dem Genprodukt eines Leserahmens im *P. furiosus* Genom homolog ist, der als kodierendes Gen für eine Vanadat-sensitive ATPase annotiert wurde. Die Expression des entsprechenden Leserahmens von *P. woesei* ergaben jedoch keine DIPS-Aktivität für das rekombinante Protein. Weitere Versuche müssten zeigen, ob der negative Befund damit begründet ist, dass das Genprodukt generell keine DIPS-Aktivität besitzt, oder dass fehlende Proteinmodifikationen oder fehlende Proteinkomponenten eine entsprechende Aktivität verhindern.

Zur Identifizierung der NDP-I1P-NT wurden sechs Leserahmen von *P. woesei* in *E. coli* exprimiert, die Homolog zu Leserahmen des *P. furiosus* Genoms darstellen und als Gene für Zucker-Nukleotidyltransferasen annotiert waren. Einer dieser Leserahmen exprimiert ein Genprodukt, das eine Aktivität als NDP-I1P-NT mit CTP aufweist.

Als Basis für Strukturuntersuchungen, die zum Verständnis der Funktion und Regulation des DIP-Syntheseweges beitragen sollen, wurden Kristallisationsversuche mit IMP und IPS durchgeführt.

## 6 LITERATUR

- ACHENBACH-RICHTER L, WOESE CR (1988)  
The ribosomal gene spacer region in archaeobacteria  
*System Appl Microbiol* 10, 211-214
- AHMED H, TJADEN B, HENSEL R & SIEBERS B (2004)  
Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff pathways in *Thermoproteus tenax*: metabolic parallelism or specific adaptation?  
*Biochem Soc Trans* 32, 303-304
- ANTRANIKIAN G & GROTE R (1997)  
Die biotechnologische Bedeutung extremophiler Mikroorganismen und ihrer Enzyme  
*Landwirtschaftsverlag Münster Schriftenreihe "Nachwachsende Rohstoffe"* 10, 25-31
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZAHNG J, ZAHNG Z, MILLER W & LIPMAN DJ (1997)  
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs  
*Nucl Acids Res* 25, 3389-3402
- ARAKAWA T & TIMASHEFF SN (1985)  
The stabilization of proteins by osmolytes  
*Biophys J* 47, 411-414
- ARAKAWA T, BHAT R & TIMASHEFF SN (1990)  
Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins  
*Biochemistry* 29, 1924-1931
- ASIMOV I (1991)  
Chronology of the world – The history of the world from the big bang to modern times  
*Harper Collins books*
- BAYKOV AA, VOLK SE, UNGURYTE A (1989)  
Inhibition of inorganic pyrophosphatase of animal mitochondria by calcium  
*Arch Biochem Biophys* 273, 287-291
- BELITZ HD & GROSCH W (1992)  
Lehrbuch der Lebensmittelchemie  
*Springer Verlag Berlin* 4, 67
- BERTOLDO  
C & ANTRANIKIAN G (2002)  
Enzymes from extreme thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. Enzyme catalysis in organic synthesis  
*Drauz und Waldmann* 1, 313-334
- BERTOLDO C, GROTE R & ANTRANIKIAN G (2001)  
Biocatalysis under extreme conditions  
*Biotechnology* 10, 61-103
- BEYNON RJ, OLIVER S (1996)  
Avoidance of proteolysis in extracts  
*Methods Mol Biol* 59, 81-93
- BIRNBOIM HC & DOLY J (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA  
*Nucl Acids Res* 7, 1513-1523

## 6. Literatur

- BLÖCHL E, BURGGRAB S, FIALA G, LAUERER G, HUBER G, HUBER R, RACHEL R, SEGERER A, STETTER KO & VÖLKL P (1995)  
Isolation, taxonomy and phylogeny of hyperthermophilic microorganisms  
*World J Microbiol Biotechnol* 11, 9-16
- BLÖCHL E, KELLER M, WÄCHTERSCHÄUSER G, STETTER KO (1992)  
Reactions depending on iron sulfide and linking geochemistry with biochemistry  
*Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8117-8120
- BLUM H, BEIERS H & GROSS HJ (1987)  
Improved silver staining of plant proteins, RNA & DNA in polyacrylamide gels  
*Electrophoresis* 8, 93-99
- BLUMENTALS II, BROWN SH, SCHICHO RN, SKAJA AK, COSTANTINO HR & KELLY RM (1990)  
The hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. Development of culturing protocols, perspectives on scaleup, and potential applications  
*Ann NY Acad Sci* 589, 301-314
- BORGES N, RAMOS A, RAVEN ND, SHARP RJ & SANTOS H (2002)  
Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes  
*Extremophiles* 6, 209-216
- BRADFORD MM (1976)  
A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding  
*Anal Biochem* 72, 248-254
- BROCK TD (1967)  
Life at high temperatures; Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed  
*Science* 158, 1012-1009
- BROCK  
TD, BROCK KM, BELLY RT & WEISS RL (1972)  
Sulfolobus: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature  
*Arch Microbiol* 84, 54-68
- BROWN SH & KELLY RM (1989)  
Cultivation techniques of hydrogen-uptake activity in the hyperthermophilic archaeobacteria: continuous culture of *Pyrococcus furiosus* at temperatures near 100°C  
*Appl Environ Microbiol* 55, 2086-2088
- BROWN SH & KELLY RM (1993)  
Enzymes from high-temperature microorganisms  
*Curr Opin Biotechnol* 4, 188-192 Review
- BRYANT FO & ADAMS MWW (1989)  
Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*  
*J Biol Chem* 264, 5070-5079
- CANOVAS D, VARGAS C, CSONKA LN, VENTOSA A & NIETO JJ (1996)  
Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway  
*J Bacteriol* 178, 7221-7226
- CHEN L, SPILIOTIS ET & ROBERTS MF (1998)  
Biosynthesis of Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphate, a novel osmolyte in hyperthermophilic Archaea  
*J Bacteriol* 180, 3785-3792
- CIULLA RA, ROBERTS MF (1999)  
Effects of osmotic stress on Methanococcus thermolithotrophicus: 13C-edited 1H-NMR studies of osmolyte turnover  
*Biochim Biophys Acta* 1427, 193-204

## 6. Literatur

- COSQUER A, PICHEREAU V, POCARD JA, MINET J, CORMIER M & BERNARD T (1999)  
Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*  
*Appl Environ Microbiol* 65, 3304-3311
- COWAN DA (1992)  
Biotechnology of the Archaea  
*Trends Biotechnol* 10, 315-323
- DA COSTA MS, SANTOS H & GALINSKI EA (1998)  
An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea  
*Adv Biochem Eng Biotechnol* 61, 117-153
- DANIEL RM, TOOGOOD HS & BERGQUIST PL (1996)  
Thermostable proteases  
*Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 51-100
- DE ROSA M & GAMBACORTA A (1988)  
The lipids of archaeobacteria  
*Prog Lipid Res* 27, 153-175
- DE ROSA M, GAMBACORTA A & NICOLAUS B (1983)  
A new type of cellmembrane in thermophilic archaeobacteria based on bipolar ether lipids  
*J Membr Sci* 16, 287-294
- DE VOS WM, KENGEN SW, VOORHORST WG & VAN DER OOST J (1998)  
Sugar utilization and its control in hyperthermophiles  
*Extremophiles* 2, 201-205
- ENGEL AE (1969)  
Time and the earth  
*Am Sci* 57, 458-83
- EVGUENIEVA-HACKENBERG E, WALTER P, HOCHLEITNER E, LOTTSPEICH F & KLUG G (2003)  
An exosome-like complex in *Sulfolobus solfataricus*  
*EMBO reports* 4, 889-893
- FARIA TQ, LIMA JC, BASTOS M, MACANITA AL & SANTOS H (2004)  
Protein stabilization by osmolytes from hyperthermophiles: effect of mannosylglycerate on the thermal unfolding of recombinant nuclease A from *Staphylococcus aureus* studied by picosecond time-resolved fluorescence and calorimetry  
*J Biol Chem* 279, 48680-48691
- FIALA G & STETTER KO (1986)  
*Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C  
*Arch Microbiol* 145, 56-61
- FORTERRE PA (1996)  
Hot topic: The origin of hyperthermophiles  
*The Cell* 85, 789-792
- GALINSKI EA & SAUER T (1998)  
Production and application of natural stabilizing compounds from halotolerant bacteria  
*LeGal Y, Halvorson HO (eds) New Developments in Marine Biotechnology. Plenum Press, New York, 201-203*
- GAVRILESCU M & CHISTI Y (2005)  
Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry  
*Biotechnol Adv Review*

## 6. Literatur

- GEORGIU & VALAX (1996)  
Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*  
*Curr Opin Biotechnol* 7, 190-197
- GOVARDHAN CP & MARGOLIN AL (1995)  
Extremozymes for industry – from nature and by design  
*Chemistry and Industry* 17, 409689-409693
- GRANT SG, JESSEE J, BLOOM FR & POSTMA PW (1989)  
Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants  
*Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4645-4649
- GRUND P, ANDOSE JD, RHODES JB & SMITH GM (1980)  
Three-dimensional molecular modeling and drug design  
*Science* 27, 1425-1431
- HANAHAN D (1983)  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids  
*J Mol Biol* 166, 557-580
- HUBER H, HOHN MJ, RACHEL R, FUCHS T, WIMMER VC & STETTER KO (2002)  
A new Phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont  
*Nature* 417, 27-28
- JAENICKE, R (1997)  
What ultrastable globular proteins teach us about protein stabilization  
*Biochemistry (Moscow)* 63, 312-370
- JANCARIK K (1991)  
Sparse Matrix Sampling: A screening method for crystallization of proteins  
*J Appl Cryst* 24, 409-411
- JOHNSON KA, CHEN L, YANG H, ROBERTS MF & STEC B (2001)  
Crystal structure and catalytic mechanism of the MJ0109 gene product: a bifunctional enzyme with Inositol monophosphatase and Fructose-1,6-bisphosphatase activities  
*Biochemistry* 40, 618-630
- JORGENSEN S, VORGAS CE & ANTRANIKIAN G (1997)  
Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*  
*J Biol Chem* 272, 1633-6342
- KANDLER O (1992)  
Where next with the archaeobacteria?  
*Biochem Soc Symp* 58, 195-207 Review
- KAISTING JF (1993)  
Earth's early atmosphere  
*Science* 259, 920-926
- KIEFHABER T, RUDOLPH R, KOHLER HH & BUCHNER J (1991)  
Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation  
*Biotechnology (NY)* 9, 825-829
- KOCH R, ZABLOWSKI P, SPREINAT A & ANTRANIKIAN G (1990)  
Extremely thermostable amylolytic enzyme from the archaeobacterium *P. furiosus*  
*FEMS Microbiol Lett* 71, 21-26



## 6. Literatur

- KRAHE M, ANTRANIKIAN G & MÄRKL H (1996)  
Fermentation of extremophilic microorganisms  
*FEMS Microbiol Rev* 18, 271-285
- LAEMMLI UK (1977)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature* 277, 680-685
- LAMOS A, MARTINS LO, DA COSTA MS & SANTOS H (1998)  
Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp  
*Appl Environ Microbiol* 64, 3591-3598
- LANDFALD B & STRØM AR (1986)  
Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*  
*J Bacteriol* 165, 849-855
- LANGWORTHY TA, SMITH PF & MAYBERRY WR (1972)  
Lipids of *Thermoplasma acidophilum*  
*J Bacteriol* 112, 1193-1200
- LANGWORTHY TA & POND JL (1986)  
Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy  
*System Appl Microbiol* 7, 253-257
- LIAO HH (1993)  
Thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase are also more stable to proteinase K, urea, detergents, and water-miscible organic solvents  
*Enzyme Microb Technol* 15, 286-292
- MARTINS LO, HUBER R, HUBER H, STETTER KO, DA COSTA MS & SANTOS H (1997)  
Organic solutes in hyperthermophilic Archaea  
*Appl Environ Microbiol* 63, 896-902
- MARTINS LO AND SANTOS H (1995)  
Accumulation of Mannosylglycerate and Di-*myo*-Inositol-Phosphate by *P. furiosus* in Response to Salinity and Temperature  
*Appl Environ Microbiol* 61, 3299-3303
- MATSUDAIRA P (1990)  
Limited N-terminal sequence analysis  
*Methods in Enzymol* 182, 602-613
- MEAKIN SA, NASCH J, MURRAY WD, KENNEDY KJ & SPROTT GD (1991)  
A generally applicable technique for the extraction of restriction DNA from methanogenic bacteria  
*J Microbiol*, 14, 119-126
- MILLER SL & UREY HC (1959)  
Organic compound synthesis on the primitive earth  
*Science* 31, 245-251
- MIZANUR RM, JAIPURI FA & POHL NL (2005)  
One-step synthesis of labeled sugar nucleotides for Protein O-GlcNAc modification studies by chemical function analysis of an archaeal protein  
*J AM Chem Soc* 127, 836-837
- MIZANUR RM, ZEA CJ & POHL NL (2004)  
Unusually broad substrate tolerance of heat-stable archaeal sugar nucleotidyltransferase for the synthesis of sugar nucleotides  
*J AM Chem Soc* 126, 15993-15998

## 6. Literatur

- MONTITSCH L, DRILLER H & GALINSKI E (2000)  
Ectoine and ectoine derivatives as moisturizers in cosmetics  
*Patent* US060071 9. Mai 2000
- MULLIS KB, FALOONA S, SCHARF R, SAIKI RK, HORN G & EHRLICH H (1986)  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction  
*Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology* 51, 263-273
- NELBOEK P, FUCHS M, BUR D & LOFFLER BM (1998)  
Glycosylation of Asn-632 and Asn-651 is important for functional expression of endothelin-converting enzyme-1  
*J Cardiovasc Pharmacol* 31, 4-6.
- NEMATI M, LOWENADLER J & HARRISON ST (2000)  
Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Sulfolobus metallicus*  
*Appl Microbiol Biotechnol* 53, 173-179
- NISBET EG & FOWLER CMR (1996)  
Some liked it hot  
*Nature* 382, 404-405
- NISBET EG & SLEEP NH (2001)  
The habitat and nature of early life  
*Nature* 409, 1083-1091
- NUNES OC, MANAIA CM, DA COSTA MS & SANTOS H (1995)  
Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and "*Thermus thermophilus*"  
*Appl Environ Microbiol* 61, 2351-2357
- OHNO SJ (1987)  
Evolution from primordial oligomeric repeats to modern coding sequences  
*Mol Evol* 25, 325-9
- PACE NR (1991)  
Origin of life - facing up to the physical setting  
*Cell* 65, 531-533
- PETROVIC U, GUNDE-CIMERMAN N & PLEMENTIS A (2002)  
Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*  
*Mol Microbiol* 45, 665-72
- PICCIRILLI JA, MCCONNELL TS, ZAUG AJ, NOLLER HF & CECHE TR (1992)  
Aminoacyl esterase activity of the Tetrahymena ribozyme  
*Science* 256, 1420-1424
- PROMEGA TECHNICAL MANUAL (1994)  
*Altered sites® II* in vitro mutagenesis systems
- RAVEN N, LADWA N, COSSAR D & SHARP RJ (1992)  
Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *P. furiosus*  
*Appl Microbiol Biotechnol* 38, 263-267
- RINKER KD, HAN CJ & KELLY RM (1999)  
Continuous culture as a tool for investigating the growth physiology of heterotrophic hyperthermophiles and extreme thermoacidophiles  
*J Appl Bacteriol* 85, 118-127

## 6. Literatur

- ROSEMAN S, DISTLER JJ, MOFFATT JG & KHORANA HG (1961)  
Nucleosid polyphosphates. XI. An improved general method for the synthesis of nucleotide coenzymes. Syntheses of uridine-5', cytidine-5' and guanosine-5' diphosphate derivatives  
*J Am Chem Soc* 83, 659-663
- SAMBROOK J, FRITSCH EF & MANIATIS T (1989)  
Molecular cloning. A laboratory manual  
*Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*
- SANGER F, NICKLEN S & COULSON AR (1977)  
DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467
- SANTOS H & DA COSTA MS (2001)  
Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles  
*Methods Enzymol* 334, 302-315
- SAUER T & GALINSKI EA (1998)  
Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes  
*Biotechnol Bioeng* 5, 306-313
- SCHIDLowski M (1995)  
Isotope fractionations in the terrestrial carbon cycle: a brief overview  
*Adv Space Res* 15, 441-449
- SCHÖNHEIT P & SCHÄFER T (1995)  
Metabolism of hyperthermophiles  
*World J Microbiol Biotechnol* 11, 26-57
- SCHOLZ S, SONNENBICHLER J, SCHÄFER W & HENSEL R (1992)  
Di-*myo*-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *P. woesei*  
*FEBS Lett* 306, 239-242
- SCHOLZ S, WOLFF S & HENSEL R (1998)  
The biosynthesis pathway of Di-*myo*-inositol-1,1'-phosphate in *P. woesei*  
*FEMS Microbiol Lett* 168, 37-42
- SEARCY DG & DELANGE RJ (1980)  
Thermoplasma acidophilum histone-like protein Partial amino acid sequence suggestive of homology to eukaryotic histones  
*Biochim Biophys Acta* 26, 197-200
- SIDERIUS M, VAN WUYTZWINKEL O, REIJENGA KA, KELDERS M & MAGER WH (2000)  
The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature  
*Mol Microbiol* 36, 1381-1390.
- SIMOLA M, HANNINEN AL, STRANIUS SM & MAKAROW M (2000)  
Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress  
*Mol Microbiol* 37, 42-53
- SINGER MA & LINDQUIST S (1998)  
Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose  
*Trends Biotechnol* 16, 460-468
- STEC B, YANG H, JOHNSON KA, CHEN L & ROBERTS MF (2000)  
MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the 'missing' archaeal fructose-1,6-bisphosphatase  
*Nature structural biology* 7, 1046-1050

## 6. Literatur

- STEIN DB & SEARCY DG (1978)  
Physiologically important stabilization of DNA by a prokaryotic histone-like protein  
*Science* 202, 219-221
- STIEGLITZ KA, FOHNSON KA, YANG H, ROBERTS MF, SEATON BA, HEAD JF & STEC B (2002)  
Crystal structure of a dual activity IMPase/FBPase (AF2372) from *Archaeoglobus fulgidus*  
*J Biol Chem* 277, 22863-22874
- STIEGLITZ KA, SEATON BA, HEAD JF, STEC B & ROBERTS MF (2003)  
Unexpected similarity in regulation between an archaeal inositol monophosphatase/fructose biphosphatase and chloroplast fructose biphosphatase  
*Protein Science* 12, 760-767
- STUDIER FW & MOFFATT BA (1990)  
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes  
*J Mol Biol* 189, 113-130
- SUESS HE (1975)  
Remarks on the chemical conditions on the surface of the primitive earth and the probability of the evolution of life  
*Orig Life* 6, 9-13
- TABOR S & RICHARDSON CC (1985)  
A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes  
*Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1074-1078
- TIMASHEFF SN (1998)  
In disperse solution, 'osmotic stress' is a restricted case of preferential interactions  
*Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7363-7367
- THEIN SL & WALLACERB (1986)  
The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders  
*In: Davis (editor), Human genetic diseases, a practical approach*
- THOMM M (1996)  
Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation  
*FEMS Microbiol Rev* 18, 159-171
- WÄCHTERSCHÄUSER G (1988)  
Pyrite formation, the first energy source for life: a hypothesis.  
*System Appl Microbiol* 10, 207-210
- WALDEN H, BELL GS, RUSSELL RJ, SIEBERS B, HENSEL R & TAYLOR GL (2001)  
Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase  
*J Mol Biol* 2, 745-757
- WALDEN H, TAYLOR GL, LORENTZEN E, POHL E, LILIE H, SCHRAMM A, KNURA T, STUBBE K, TJADEN B & HENSEL R (2004)  
Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature  
*J Mol Biol* 17, 861-875
- WEIL CF, CRAM DS, SHERF BA & REEVE JN (1988)  
Structure and comparative analysis of genes encoding components C of methyl coenzyme M reductase in the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*  
*J Bacteriol* 70, 4718-4726
- WELSH DT (2000)  
Ecological significance of compatible solutes accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate  
*FEMS Microbiol Rev* 24, 263-290

## 6. Literatur

WELSH DT & HERBERT RA (1999)

Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*  
*FEMS Microbiol Lett* 1, 57-63

WINKER S & WOESE CR (1991)

A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics  
*System Appl Microbiol* 14, 305-310

WOESE CR, FOX GE (1977)

The concept of cellular evolution  
*J Mol Evol* 10, 1-6

WOESE CR, KANDLER O & WHEELIS ML (1990)

Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya  
*Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4576-4579

WOESE CR & OLSEN GJ (1986)

Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdom  
*System Appl Microbiol* 7, 161-177

WOESE CR (1987)

Bacterial evolution  
*Bacteriol Rev* 51, 221-271

WOLFF S (2001)

Die Biosynthese von Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat des hyperthermophilen Archaeums *P. woesei*  
*Dissertation* Universität Essen

WOOD JM (1988)

Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria  
*J Membr Biol* 106, 183-202 Review

ZEAL CJ & POHL NL (2004)

General assay for sugar nucleotidyltransferases using electrospray ionization mass spectrometry  
*Anal Biochem* 328, 196-202

ZWICKEL P, FABRY S, BOGEDAIN C, HAAS A & HENSEL R (1990)

Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus woesei*: characterization of the enzyme, cloning and sequencing of the gene, and expression in *Escherichia coli*  
*J Bacteriol* 172, 4329-4338

ZILLIG W, HOLZ I, KLENK HP, TRENT J, WUNDERL D, JANEKOVIC, INSEL E & HAAS B (1987)

*Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, *Thermococcales*  
*System Appl Microbiol* 9, 62-70

## 7 ANHANG

```

1 AATAGATATTATCGGCAAAACCCGAAAATTTCATAGACACATCATGAAGCTGCTAAAAATCTATTACGGCGATTGGCGAGCTTCTTTAATC
1 * T H H E A A K I Y Y G D W R A S L I
91 GTTAGAAAGGGTTTGAACCGAAAAGTATTTATACCCCGCACTGACACACATATAGATGAAGCCCGTATGGCGAGATTATTGGGAGGTGG
19 V R K G G L E P K S I Y T P H * H T Y R * S P Y G Q I I G R W
181 AGAAAAATGAAAAGTTAAGAAGATTGCGGCCCTTGCAGTTGGTGCCGCACTAGCTGGTGCAACCCCTGGCTTTGCAAGTGCCCAAGCGGAA
49 R K M K V K K I A A L A V G A A V A G A T L G F A S A Q G E
271 GTCCCCGAGATACCAAAGGACTTCTTTGTTAAGGATGGAAAGCCAAACGTTAAGATCGTTGTTGGTAGTGAAGGAGCTGCTATGGACGTT
79 V P E I P K D F F V K D G K P N V K I V V G S E G A A M D V
361 GTGAGCCGAGCCGATATTGCCGCTGCAATTGGAAGCTTACTCTACACCGAGAAGGATGTTGAAGTTACCGACGCTACAGTGGTTGCAAGG
109 V S A A D I A A A I G S L L Y T E K D V E V T D A T V V A R
451 AAGGATGTAAACGAACCCATTGAAAAGATACCTGTCTTTGACAACCTACGACACAAATACAGCTCACAATACAAGTTGGAGACAATCTA
139 K D V T E P I E K I P V F D N Y D T N T A H K Y K V G D N L
541 AAAGATGTACCAGCCTGGTGAACGGATCAGACTTTGTAGCTAACTTCTCAACATCAGTTTGAATGATGGTGTATATGACAAGGCAGTG
169 K D V P A W W N G S D F V A N F S T S V W N D G V Y D K A V
631 GAGATCAGGATTGACAATATTGGAAGCGTTGGGAGCTATGACCTTGCAGCAAACTAACACTTAAGGGAATTGCTCTCGACGGCATAACT
199 E I R I D N I G S V G S Y D L A A N L T L K G I A L D G I T
721 GACAGTGAAGTTGATGTAATTGACGACTTTGAGGACTTCACAGTTAACGTAAGTACAGTGGTTGCAACATATCACTTGTAGTATACAAC
229 D S E V D V I D D F E D F T V N V S T V V A N I S L V V Y N
811 TATACACTCAAAGGACAACCTACAGTTGACAAGATAACAAAGGATGAAACAATACCGAAGTAACCTTAATCACAAAATCTGTTCCCTTGAC
259 Y T L K G Q P T V D K I T K D E T I P E V N L I T N L F L D
901 AACAGCACACTCGCAAAGTTCTATCCAGACTACGACGTTTACACCATAGAGGGAGTTAAGGTTCTTAAGTCAGGAGTTGGTGAAGGAGAA
289 N S T L A K F Y P D Y D G Y T I E G V K V L K S G V G E G E
991 ACCCTAAAGATCCTTGACAATGAATATCCAATAGTCTTCATTGGAAAAGACATTCAAGAAACAGCTTGTGGAGATTGCTTCACCTATGGT
319 T L K I L D N E Y P I V F I G K D I Q E T A C G D C F T Y G
1081 AAGGACTGGGGCGAGGACTACTACAACAGGGTGAAACATACAACCTTCGGAGACTACAAGGTCACAATCCTTGATATTGATGTTGCAAGA
349 K D W G E D Y Y N Q G E T Y N F G D Y K V T I L D I D V A R
1171 GACAAGGCATTCATAAAGGTTGAGAGCCCAAGTGGAGATCTGAGACAACCTACTCTCGCAGTTGGTGGTACAGAGGCACAAACCTTCTTC
379 D K A F I K V E S P S G D T E T T T L A V G G T E A Q T F F
1261 GACGGAGGCATAAGAATCCAGATAAAGGACACCTTCGTAGGTATCAGCGGTACAAACGCAGTAAACTCCACGCTCGGACAGACCTCAAG
409 D G G I R I Q I K D T F V G I S G T N A V K L H V W T D L K
1351 ACAGTAAAGATGGAGACGAAATAATGCCCTGGATGGATAGCAGAGTTCAAGGTGACAGTGGAAAGATTATATGGTTCCGCCCTTGAAAAC
439 T V K S G D E I M P G W I A E F K V D S G K I I W F A L E N
1441 AAGAACACACTCTCCGACAAGAGAGTGCCATTTATTCACACCTACGCTGTAGACTACAAGGCAACGATAAGGAAGAAGAAAAAGACGAT
469 K N T L S D K R V P L F N T Y A V D Y K A T I R K K K K D D
1531 GTAGGTACGGTACACTAACAGCCTACATCTACATCGAGCCACTGGAGACACAGTATGAGACAGTAGAGGCAGCAATAGGAGAGTCAATT
499 V E Y G T L T A Y I Y I E P L E T Q Y E T V E A A I G E S I
1621 GATGACTATGAAGTTGTAGACGTCAAAGCTGAGGTCCAGAGGTTGCTTATATCCACAGAAGCTAAACCGCTCCCAATCACAGTCCCTT
529 D Y E V V D V K A E V S P E V A Y I P Q K L T A P I T V L
1711 GACACCGAAGTCCTTGAGCAAGGACTAGAGAAGTACGAGCAACCTAATCCTAGTGGGTGGTCCAGTCCGTCACAAAGGTAAGTCAAGCC
559 D T E V L E Q G L E N V G S N L I L V G G P V V N K V T A A
1801 TTAGCTGAAGACCTAGGAGTTCCACTCACCTACGAAGAGTGGGCCGAGAAGTTCCGTTACTGGTAAGGAAGGATGGACTATCGTCTACAAG
589 L A E D L G V P L T Y E E W A E K F G T G K E G W T I V Y K
1891 GAGCAGTGGCGCAAGATTGGAGGCTACGGTGTAGTCCTAGTAGCAGGTAGCGACAGAGAAGGAACAGAGCAGCTGCAGAGGCATTGCTC
619 E Q C G K I G G Y G V V L V A G S D R E G T R A A A E A L L
1981 GACTACATTGCAAACTTGAGTGAATCCCTTCTCTCTTCTTTAATCTCTTCCCTGGAGGTTTAAATGTGAGAAAGTATATAGCGGGA
649 D Y I A N L E * S L L F F F N S S S L E V * M * E S I * R E
2071 TTTTTCGATTACGATTATTTTAGCAAGTATTGGGATTACTGCAT
679 F F * L R L F *

```

**Abb. Anhang 1: Nukleotidsequenz des Klons pET24*adips* (1263 bp):** Die für die putative DIPS aus *P. furiosus* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 186 bis 2003 (im Genom 1312763 – 1314580). Die korrespondierende Aminosäuresequenz (605 AS) ist darunter dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert. Die Primer sind fett gedruckt. Strukturen der Transkription BRE-Site TATA-Box und Terminationsstelle sind grau unterlegt.

## 7. Anhang

```

1 TTCTATCTTTTATTTAAATATCAATAATGGGGAGTTAGTATGAAA
1      * W G V S M K
46 GCTATAAATACTTGCCGCTGGAAAAGGTGAAAGGCTTAGGCCACTC
16 A I I L A A G K G E R L R P L
91 ACTGATGATAGGCCAAAGGTTGTTCTAAAGATCGCCAACAAACCA
31 T D D R P K V V L K I A N K P
136 ATAATTAGCTATGTTCTTGAAAACCTTGACCCATTTGTAGATGAA
46 I I S Y V L E N L D P F V D E
181 TTTATCATAGTTGTTAAGTACATGAAGGAGAAAGTTATTGATTTA
61 F I I V V K Y M K E K V I D L
226 CTCGGTGATGAATTTTCGCGGAAAGCCAATAACTTATGTGGAGCAG
76 L G D E F R G K P I T Y V E Q
271 GGAGAAGAAGAGGGAACAGCTGCAGCAGTGTATTCCGTAAGAGAG
91 G E E E G T A A A V Y S V K E
316 TTTATAGAGTCTAATGAAGAGTTTTTCGTTGTCAATGGCGATTTA
106 F I E S N E E F F V V N G D L
361 TATTTTGAACCCGATGCAGTAAAGGGCCTTCTTCATGTTTTCAA
121 Y F E P D A V K G L L H V F K
406 AAAGAGAAAGGAGATGCAGGCATCGTTGTGAAAGAATTTGAGAAC
136 K E K G D A G I V V K E F E N
451 CTCAGCCAATATGGAATGGTAGAGGTAGAGAACGGTAAGGTGAAA
151 L S Q Y G M V E V E N G K V K
496 GGGATAATAGAAAAGCCAGGCAATTCAAAGGATATGCAAACCTA
166 G I I E K P G N V K G Y A N L
541 GGAATATACATTTTCAAGTCAGATGTCTTTGATTACATAGAGAAC
181 G I Y I F K S D V F D Y I E N
586 ACCGAAATAAGTGAGAGGGGAGAATATGAGATTACAGACACGATA
196 T E I S E R G E Y E I T D T I
631 AACCTCATGATAAAAGATGGCAAAAGTGTGGTTTACTACAACCTAT
211 N L M I K D G K S V V Y Y N Y
676 GAAGGATTCTGGAGCGATATTGGAAGGCCATGGGACTTACTTGAA
226 E G F W S D I G R P W D L L E
721 GTGAATGAATACATTCTAAAACTAAGCTAAAAACACGAGATAAGA
241 V N E Y I L K T K L K H E I R
766 GGAGTTGTCTGAAGAGGGAGCAACAATAATCCCACCTGTGGAAATT
256 G V V E E G A T I I P P V E I
811 GGAGAGGGAACAATAGTAAGGGCAGGAAGCTACATAATCGGGCCC
271 G E G T I V R A G S Y I I G P
856 GTTAAGATCGGAAAAAACTGTAGAATCGGGCCGAACTGCTACATA
286 V K I G K N C R I G P N C Y I
901 AGACCATATACAAGCATAGGAGACAACCTGCCACATAGGAAATGCC
301 R P Y T S I G D N C H I G N A
946 GTTGAAGTTAAAAATTCCATAATAATGGATAATTCAAATGCCCCCT
316 V E V K N S I I M D N S N A P
991 CACTTAACTATGTTGGGGATTCAATAATCGGGGAAAAACACAAAT
331 H L N Y V G D S I I G E N T N
1036 CTTGGGGCTGGAACAATAACAGCTAACTTGAGACACGACAAGGGA
346 L G A G T I T A N L R H D K G
1081 ACTATCAAGGTTGAAGTTAAAGGAAAGTTAGAGGATTCAAGGGAGG
361 T I K V E V K G K L E D S G R
1126 AGAAAGCTCGGTGCAATAATTGGGCACAACGTAAAAGTAGGGATA
376 R K L G A I I G H N V K V G I
1171 AACGTCACAATTTATCCAGGAAGAAAAATTGGTAGTAACCTCTTTC
391 N V T I Y P G R K I G S N S F
1216 ATAGGCCAGGAGTTATAGTTGATAAGAACATCCACAAAACGTT
406 I G P G V I V D K N I P Q N V
1261 CTTGTTACAGTTAAGCAGGAGAAAAAGGTGATTGAGAAATGATTA
421 L V T V K Q E K K V I E K *
1306 TTCCAATTTTAAATTTTGTTCACGATTGATATTGGCCGGAACCTT

```

**Abb. Anhang 2: Nukleotidsequenz des Klons pET11*ctrans1* (1263 bp):** Die für die Transferase 1 aus *P. furiosus* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 40 bis 1300. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (420 AS) ist darunter dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert.

## 7. Anhang

```

1 AGATAAGATATTTTAAAGTTTGGTGGAAAGATCAGGGAGCTGGAGA
1 M R E L R
46 TATAACCCCTCACAGGTCAGTGGATCATGGTGTCTGCAGTTAGG
16 Y N P L T G Q W I M V S A V R
91 AAAAAAAGACCATGGAGACCCACAAATTTCTGTCCATTTTGCCCA
31 K K R P W R P T N F C P F C P
136 GGAAGCGAAGAGACAGGTTATGGATGGAAAGTTCTTTTGCTTCCA
46 G S E E T G Y G W K V L L L L P
181 AATAGATTCCCAATGTTATCTTTTGATGCCCAAAACCTGAGAGT
61 N R F P M L S F D A P K P E S
226 GAGGAATTTTACAAGAAAGCTAGGGCAATTGGCCAGTGTAGTGTT
76 E E F Y K K A R A I G Q C S V
271 ATCGTCGAGACACCAGATCATGATCTTAAAGATCTAGACGAGCTT
91 I V E T P D H D L K D L D E L
316 CCCAGGGAGCAAATGGTTAAGGTTGTTGAACTGTGGGTAGAGGCT
106 P R E Q M V K V V E L W V E A
361 ACGAAAACACTAAAGGAAAATCCCCACGTTGCTTATCTCGCGATA
121 T K T L K E N P H V A Y L A I
406 TTTAGAAATAAAGGGGAGGAAATTGGAGTAAGCTTAACTCATCCC
136 F R N K G E E I G V S L T H P
451 CACGGCCAGCTTTATGCCCTTCCGTATATTCTCTCAAAGCTAGA
151 H G Q L Y A L P Y I P L K A R
496 CTCAAAATAGAAAACCTCTAGAAAGTACTACAAGAGCAAAAATGAA
166 L K I E N S R K Y Y K S K N E
541 TGTTTGTCTGTAGGATACTTAAAGAAGAAAAAGAAAGTGAAGAG
181 C L F C R I L K E E K E S E E
586 AGAATTATCTACGAAAATGACAACTTTATAGTTTTCATGCCCTTC
196 R I I Y E N D N F I V F M P F
631 TTTGCAAGTTGGCCTTTTCGAAATGCACATTTATCCAAAAAGACAC
211 F A S W P F E M H I Y P K R H
676 GTTCAGTATTTAACAGACCTCAACAAGGAAGAAATAGAAAGCTTG
226 V Q Y L T D L N K E E I E S L
721 GCGGATGCAATTCAAGCTACCACTGGAACCTTAAACACCATTTTA
241 A D A I Q A T T G T L N T I L
766 GAAAGGCAAATGCCCTACACAATGATGATATTCCAGGCTCCATTT
256 E R Q M P Y T M M I F Q A P F
811 AAAGGAACTACAAGTTTTATCACCTACACATAGAGTTCTACCC
271 K G N Y K F Y H L H I E F Y P
856 ATTTTAAGAGACAATGGAAAGATCAAATACGCAGCAGGAATTGAA
286 I L R D N G K I K Y A A G I E
901 ATGGGTACATGGGAATTTACATACGATGCAATCCCAGAAGAAAAC
301 M G T W E F T Y D A I P E E N
946 GCCAGAAAGCTTAAAGAGGCATGCAAAAAGTTTCACAAAGACTT
316 A R K L K E A C K K V S Q R L
991 AACCTTAAAGGGAAATGTATTTAAGCTCTCCTACGTCTCTTTTTC
331 N L K G K C I *

```

**Abb. Anhang 3: Nukleotidsequenz des Klons pET11*trans2* (984 bp):** Die für die Transferase 2 aus *P. furiosus* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 31 bis 1012. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (327 AS) ist darunter dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert.



## 7. Anhang

```

1 ATTCCAACAAATATGGGGGATAAACGTATGAAGGTTCTAATAATG
1                               M K V L I M
46 GCCGGAGGCTATGCTACTAGGTTATGGCCAATAACAAAAAATAAA
16 A G G Y A T R L W P I T K N K
91 CCTAAACCCCTTCTTCCAGTTGGCAATAAAACAATAATAGAACAC
31 P K P L L P V G N K T I I E H
136 ATTTTAGAAAAAGCTGGCTAATATAAAATATCCTATTTTATGTTTCA
46 I L E K L A N I K Y P I Y V S
181 ACAAATAAAATTCTTTGAAAAGAGCTTTAGAGAGAAGCTATCGAAA
61 T N K F F E K S F R E K L S K
226 TACGATGTTGAACTAATTGTAGAGAAATTCATATAGGGAAGAAGAA
76 Y D V E L I V E N S Y R E E E
271 AAGTTTGGAACAATTGCCGCAATTAAAAATGCAATTGAAACAATA
91 K F G T I A A I K N A I E T I
316 GGAGATGATGATTACCTCATAATATCTGGGGACAATTTGTTTTC
106 G D D D Y L I I S G D N L F S
361 CTATCAATAGAGGACTTTCTCTCAAGATTTGATGAAGTAAAGAAA
121 L S I E D F L S R F D E V K K
406 ACTCTAATAGCCGTTTATGATATCGGAGACTTTGAACTAGCCAAG
136 T L I A V Y D I G D F E L A K
451 AGGTATGGTGTAGTTGTTCTGGAGATACTGTTAGGATAAGCGGTA
151 R Y G V V V L E I L L G *
496 GGGCGTTAGGTTTAAGTTTCTGATAATTTTTCAGAAAAAGAAGGG

```

**Abb. Anhang 4: Nukleotidsequenz des Klons pET11*ctrans3* (462 bp):** Die für die Transferase 3 aus *P. furiosus* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 28 bis 487. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (153 AS) ist darunter dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert.

## 7. Anhang

```

1 AAAAAGTAGTGGAGGTTGAAAGCAGTGCTGAGCAATTTGAGACCA
1                               V L S N L R P
46 TTGGCGAAAAAGCCACTGGAAAAAGATAGCTGAGCCATTCTCAAAG
16 L A K K P L E K I A E P F S K
91 CTTGGCATAACTCCTAATCAACTCACTATGGTTGGATTTTTCCTG
31 L G I T P N Q L T M V G F F L
136 TCTTTACTTGCATCTTATGAATATTACCTCAATAATCAGGTTTTT
46 S L L A S Y E Y Y L N N Q V F
181 GGCTCATTAATACTATTACTTGGGGCGTTCTTAGATGCTTTAGAT
61 G S L I L L L G A F L D A L D
226 GGGAGCCTAGCAAGGTTAACCGGAAGAGTTACAAAATTTGGTGGT
76 G S L A R L T G R V T K F G G
271 TTTCTCGATTCTACGATGGATAGGCTTAGCGATGCAGCAATAATC
91 F L D S T M D R L S D A A I I
316 TTTGGAATTGCATTGGGAGAGTTAGTTAATTGGAAAAGTAGCGTTT
106 F G I A L G E L V N W K V A F
361 TTAGCGTTAATAGGCTCTTACATGGTAAGCTATACAAGATGTAGG
121 L A L I G S Y M V S Y T R C R
406 GCTGAATTAGCTGGTTCTGGAACTTTAGCAGTTGGAATTGCTGAG
136 A E L A G S G T L A V G I A E
451 AGGGGAGAGAGATTATTGATTCTTGTTATTGCAGGATTATTTCGGA
151 R G E R L L I L V I A G L F G
496 ATTATTGATATTGGTGTGTATCTGGTTGCAATACTCTCTTGGATA
166 I I D I G V Y L V A I L S W I
541 ACCTTCTTGCAAAGAGTTTATGAAGCAAAGAAAAGGCTTGAAAAA
181 T F L Q R V Y E A K K R L E K
586 TAGGGATGATGAGATTTGCTACCTCTGAAAAATAATGATGAACCCCT
196 *
631 GCCGTTACTG

```

**Abb. Anhang 5: Nukleotidsequenz des Klons pET11c*trans4* (564 bp):** Die für die Transferase 4 aus *P. furiosus* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 25 bis 585. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (187 AS) ist darunter dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert.

## 7. Anhang

```

1 AATGAAAGAGAAGAACAGGGGAAAGGCAGTGAAAGTCATCCACCA
46 CGCGAGGGATAAGATATGGGGAGATAACCGCAAGGTAAGGGTTGTG
   * D M G D N R K V R V V
91 GTGGGAGGTGTTTTTCGACATCCTCCACGTCGGCCATGTCCACTTT
31 V G G V F D I L H V G H V H F
136 TTGAAGATGGCTAAGGAGTTGGGTGATGAGTTAATAGTTATTGTT
46 L K M A K E L G D E L I V I V
181 GCCCATGATGAAACCGTGAAGAGGAGAAAAGGAAGACCTCCTATT
61 A H D E T V K R R K G R P P I
226 AATCCAGCTGAAGACAGGGCAGAACTGCTCAAGAGTATTAGGTAT
76 N P A E D R A E L L K S I R Y
271 GTGGATGATGTTGTGATTGGAGAACCGGGTGAAATAAGTATAGAT
91 V D D V V I G E P G E I S I D
316 TTGATAAAAAGGCTGAAGCCGGACGTAATAGCCTTGGGACCAGAT
106 L I K R L K P D V I A L G P D
361 CAAGATTTTAGTTGCGAGGAGTTAAAGAAGAGGCTCAGAAAAGAG
121 Q D F S C E E L K K R L R K E
406 GGAATAAATGCGGAGGTTATCAGGTTGCCCTACTTGTATAAGTCC
136 G I N A E V I R L P Y L Y K S
451 GATAGGGCAAAGACAAGTAAGATAATTCAGAGAATAATCGAGACG
151 D R A K T S K I I Q R I I E T
496 TTTTGTGAATGAAGTCCAACTTTCAATTCTTTTGTAGTCTTATT
166 F C E *
541 GGAACCGGAGGCTCTACCTAATCATCCTCTTGACACAACCTCCTTT
586 CAATTCTTTTGTAGT

```

**Abb. Anhang 6: Nukleotidsequenz des Klons pET11*ctrans*7 (447 bp):** Die für die Transferase 7 aus *P. furiosus* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 61 bis 507. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (149 AS) ist darunter dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert.

## 7. Anhang

```

1  TGGGAAAATTGTTATTGACGGTAGGAGAATTAGAGCTGCCGAGAA
46 AACAGCGAGAATTTACGAGGGGGTGTGCTGGTGAAAGTGAGAAAA
16      V K V R K
91  GCGGTAATTCCAGCAGCAGGCCTTGGAAACAAGAATGTTACCACTG
31  A V I P A A G L G T R M L P L
136 ACTAAAGCACAAACAAAAGAAATGCTCCCTGTTGTGAGAAAGCCA
46  T K A Q P K E M L P V V R K P
181 ACTATCCAATATGTTCTCGAAGAAGCTTATGAGGCTGGGATACGA
61  T I Q Y V L E E A Y E A G I R
226 GAAGTTTTGATAATAACGGGAAAACATAAGAGGGCAATCGAAGAT
76  E V L I I T G K H K R A I E D
271 CATTTTCGATAGATATGAGCATGAAGTGAAAAATCCACATCTTGAC
91  H F D R Y E H E V K N P H L D
316 AAATTGGATAAAATCCTCGATGATATAAATATCTACTATGCTAGA
106 K L D K I L D D I N I Y Y A R
361 CAGAGAGTACAAAGGGGATTGGGGGATGCTATCAAATATGCAGAG
121 Q R V Q R G L G D A I K Y A E
406 GCTTTTCGTTGGCGATGAACCCCTTTGCTCTCCTCTTGGGGGATACT
136 A F V G D E P F A L L L G D T
451 ATTAACTCCCTTCTTGTACTGCTGGAATAATAGAATCCTATGAA
151 I T L P S C T A G I I E S Y E
496 GAATTAAAGGCCCCGGTAATCGCTGTGGAAGAAGTTCAAGAGGAG
166 E L K A P V I A V E E V Q E E
541 AAAATTTCTCTCTATGGAGTTGTTGGGATAGGGAGATATATTAAT
181 K I S L Y G V V G I G R Y I N
586 GAAAGAATATTTGAGATAAACAAGCTAGTTGAAAAGCCAGAAATT
196 E R I F E I N K L V E K P E I
631 CACGAAGCTCCATCAAATTTGGCCATTTTAGGAAGGTACATTTTA
211 H E A P S N L A I L G R Y I L
676 ACCCCCGAAATCTTTGAGTATTTGGAGGAGGTAAAGCCTGATAAA
226 T P E I F E Y L E E V K P D K
721 AAGGGAGAAATACAGCTCACAGATGCTCTAGAGTTAATGGTTCAG
241 K G E I Q L T D A L E L M V Q
766 AATGGGAAGAAAATTTACGGCTATGTGTTTAAGGGCAGGCGTTAT
256 N G K K I Y G Y V F K G R R Y
811 GACATTGGTAACATTTTGTATTGGCTACGGGCAAATATTGAATTA
271 D I G N I F D W L R A N I E L
856 GGATTAGAAGATGAAGAACTTAGTGAAAAGCTAAGAGAACTTATC
286 G L E D E E L S E K L R E L I
901 AAATCGTTAGTGGGGGAAAGAATATGATGGACCCGATAAAGTCAG
301 K S L V G E R I *
946 ATGTAAAGAGAAATTGTAAGAGCATTAGATAGTGCTAATTTTGAGG
991 GTAAGACTGCTCTGGTTACAGGTGGTGCTG

```

**Abb. Anhang 7: Nukleotidsequenz des Klons pET11*trans8* (849 bp):** Die für die Transferase 8 aus *P. furiosus* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 77 bis 924. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (283 AS) ist darunter dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert.

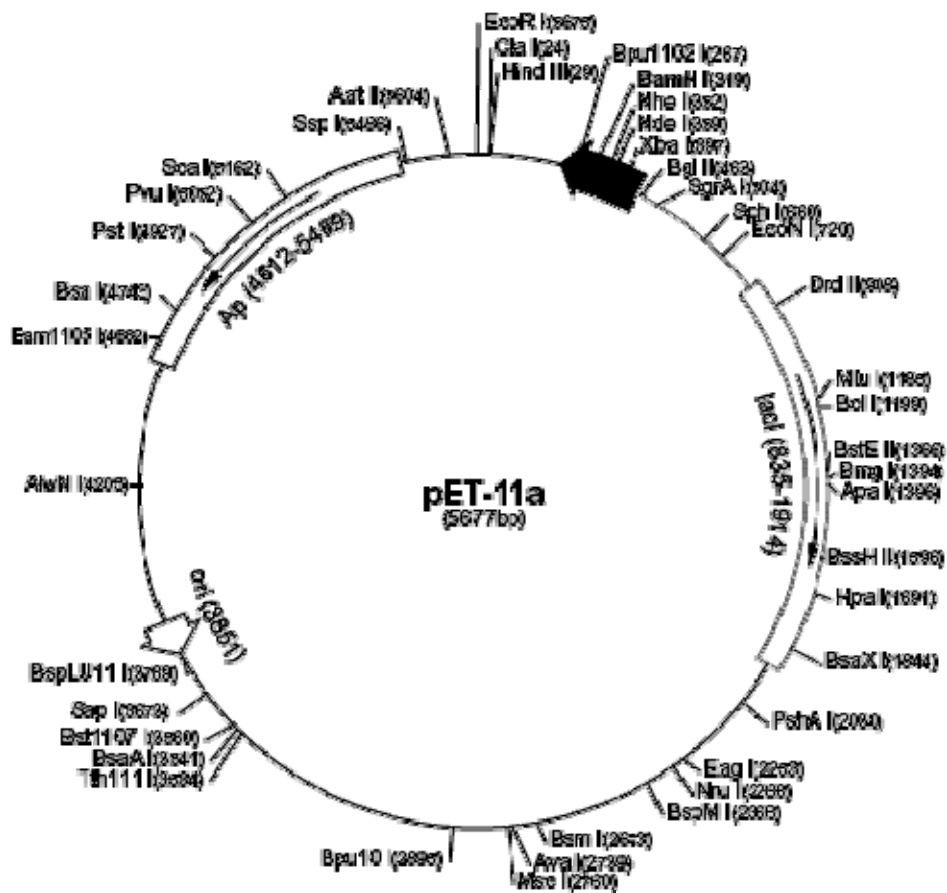


Abb. Anhang 8: pET11 a-d Plasmid Novagen [MOFFATT & STUDIER, 1986; ROSENBERG et al., 1987; STUDIER et al., 1990]; Der pET11 Vektor trägt einen N-terminalen T7-Tag® Sequenz und eine *Bam*HI cloning site. Diese Vektoren sind die Vorläufer vieler pET Vektoren. Die Sequenz ist nach der Konvention pBR322 bechriftet, weshalb die T7 Expressionsregion revers auf der Vektorkarte gezeigt ist. Die Klonierungs- und Expressionsregion des kodierenden Strangs, die von der T7 Polymerase abgelesen wird, befindet sich dahinter.

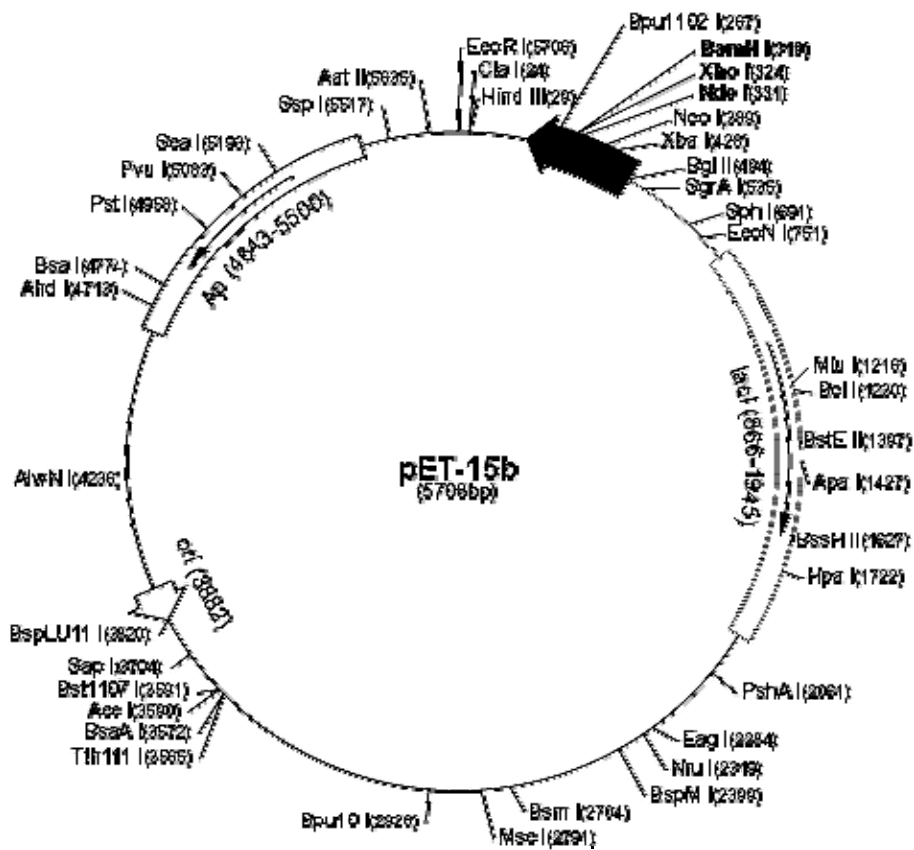


Abb. Anhang 9: pET15 b (+) Plasmid Novagen [MOFFATT & STUDIER, 1986; ROSENBERG et al., 1987; STUDIER et al., 1990]: Der pET24 Vektor trägt einen N-terminalen T7-Tag® Sequenz mit anschließender Trombinschnittstelle und drei *cloning sites*. pET15b trägt ebenfalls eine Ampicillin-Resistenz. Die Sequenz ist nach der Konvention pBR322 beschriftet, weshalb die T7 Expressionsregion revers auf der Vektorkarte gezeigt ist. Die Klonierungs- und Expressionsregion des kodierenden Strangs, die von der T7 Polymerase abgelesen wird, befindet sich dahinter.

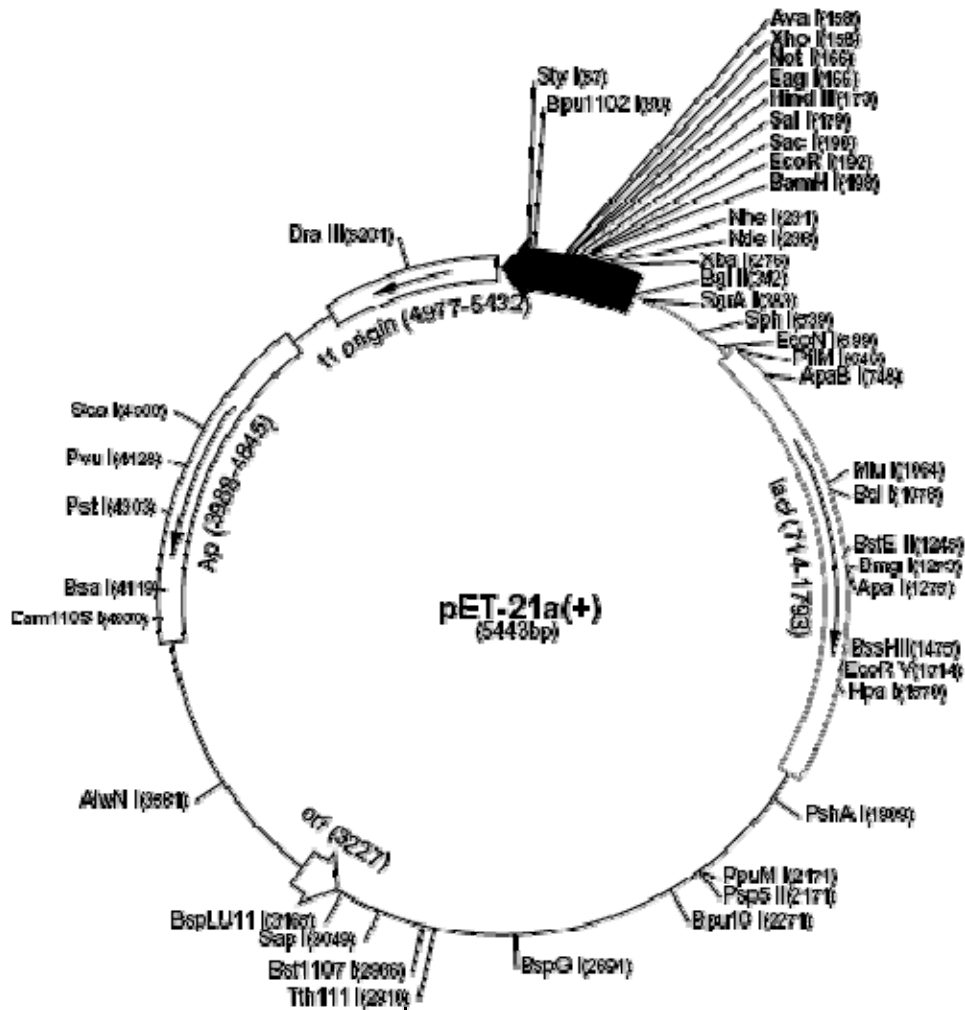


Abb. Anhang 10: pET24 a-d (+) Plasmid Novagen [MOFFATT & STUDIER, 1986; ROSENBERG et al., 1987; STUDIER et al., 1990]: Der pET24 Vektor trägt einen N-terminalen T7-Tag® Sequenz und zusätzlich eine C-terminalen His-Tag®. Unterschied zum pET11c liegt in der Kanamycin-Resistenz anstelle der Ampicillin-Resistenz. Die Sequenz ist nach der Konvention pBR322 beschriftet, weshalb die T7 Expressionsregion revers auf der Vektorkarte gezeigt ist. Die Klonierungs- und Expressionsregion des kodierenden Strangs, die von der T7 Polymerase abgelesen wird, befindet sich dahinter.

## DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom September 2001 bis Juni 2005 in der Firma bitop AG in Witten-Annen und an der Universität Duisburg-Essen Campus Essen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Hensel angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Hensel für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für die Unterstützung bei allen durchgeführten Arbeiten dieses interessanten und abwechslungsreichen Projektes.

Den beiden Gruppenleitern PD. Dr. Bettina Siebers und Dr. Klaus Michalke danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft, ihre wertvollen Anregungen und ihre freundliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt vor allem Thomas Knura für die Hilfe im Labor, intelligente Lösungsansätze und schnelle Reparaturen jedweder Geräte „never change a running system...“.

Besonders möchte ich dem gesamten „Frauenlabor“ Dr. Britta Tjaden, Melanie Zaparty, Hildegard Eling, André Plagens und Fabian Blombach danken, die stets für mich da waren. Wir haben viel zusammen durchgestanden.

Danke Britta für die Hilfe bei allen Fragen zur Molekularbiologie... „ich muss mich nur ein wenig vom Bildschirm entfernen und schon sehe ich Schnittstellen, BRE-Sites und Shine-Dalgarno-Sequenzen etc.“....erstaunlich, man muss dazusagen auf der ganzen Seite stehen nur A,T,G und Cs.

Den Mitgliedern des „Männerlabors“ danke ich natürlich auch Hatim Ahmed, Jörg Meyer Patrick Moritz und Frank Thomas.

Ein großer Dank gilt Herrn PD. Dr. Arndt Petersen aus der Arbeitsgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie am Forschungszentrum Borstel für die N-terminale Sequenzierung der putativen DIPS.

Ich danke allen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Bayer, Alma Rüppel, Dr. Christina Hartmann-Fatu, Tina Stratmann, Dr. Jonathan Wolff Müller, Daniel Kessler und Christian Sinnen für die viele Hilfe bei der Kristallisation und Bereitstellung Ihrer Geräte.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. F.G. Klärner besonders Carla Verhaelen, Marçal Casas Cartagena und Herrn Heinz Bandmann sei gedankt für die Betreuung bei der chemischen Synthese von CDP-I und NMR-Analysen aller Substanzen.

Annette Schmidt, Dr. Christiane Wittmann und Regina Wegner, ohne Euch drei hätte ich schon oft das Handtuch geschmissen.

Meine Eltern haben mir durch Ihre Geduld, Ihr Vertrauen und Ihre Unterstützung diesen Weg ermöglicht. Ohne Sie wäre ich nicht so weit gekommen. Meinem Bruder, Onkel Hartmut und Anna danke ich für ein bisschen Heimat und Geborgenheit.

Vielen Dank auch an alle, die ich hier nicht namentlich erwähnen konnte, damit die Danksagung nicht länger wird als die gesamte Arbeit.



## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Bianca Reichstein  
Adresse: Alfredstrasse 22, 45130 Essen  
Geburtstag: 08.09.1975  
Geburtsort: Gifhorn  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Eltern: Apotheker Hans-Jürgen Reichstein  
Apothekenhelferin Barbara Reichstein, geb. Schulz

### AKADEMISCHER WERDEGANG

2001 – 2005 Promotion an der Universität Duisburg-Essen  
Abschluss: Dr. rer. nat.  
1995 – 2001 Studium der Biologie an der  
Christian Albrechts Universität zu Kiel  
Abschluss: Diplom (Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie,  
Biochemie)

### SCHULISCHER WERDEGANG

1988 – 1995 Erich Kästner Gymnasium Laatzen  
1986 – 1988 Orientierungsstufe Rathausstrasse  
1982 – 1986 Grundschule Ingeln-Oesselse

### DIPLOMARBEIT

Zeitraum: August 2000 – August 2001  
Betreuer: Prof Dr. Peter Schönheit am IFAM Kiel,  
Dr. Thomas Hansen  
Thema: „Zuckerstoffwechsel hyperthermophiler Archaea  
– Stärkeabbau in *Aeropyrum pernix*“

### PROMOTIONSARBEIT

Zeitraum: September 2001 – April 2005  
Betreuer: Prof Dr. Reinhard Hensel Fachbereich Mikrobiologie  
Thema: „Produktionsverfahren für Di-*myo*-Inositol-1-1'-phosphat:  
Isolierung im Technikumsmaßstab und Versuche zur  
Etablierung eines rekombinanten Synthesystems in *E.coli*“

## ERKLÄRUNGEN

Hiermit erkläre ich gemäß § 6 Abs 2, Nr 7 der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie und Geografie der Universität Duisburg Essen, Campus Essen zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Produktionsverfahren für Di-*myo*-Inositol-1-1'-phosphat: Isolierung im Technikumsmaßstab und Versuche zur Etablierung eines rekombinanten Synthesystems in *E.coli*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Bianca Reichstein befürworte.

Essen, den

Prof. Dr. Reinhard Hensel

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs 2, Nr 6 der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie und Geografie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Bianca Reichstein

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs 2, Nr 8 der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie und Geografie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Bianca Reichstein